



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82983 (13) C2  
(51) МПК  
C07K 14/475 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОЛІМЕРНІ КОН'ЮГАТИ НАЙБЛАСТИНУ ТА СПОСОБИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

1

2

(21) 2003088104

(22) 25.01.2002

(86) PCT/US02/02319, 25.01.2002

(31) 60/266,071

(32) 01.02.2001

(33) US

(46) 10.06.2008, Бюл.№ 11, 2008 р.

(72) САХ ДІНАХ В.У., ПЕПІНСКІ Р. БЛЕЙК, БОРДЖЕК-С'ЄДІН ПАУЛА ЕНН, МІЛЛЕР СТЕФАН С., РОССОМАНДО ЕНТОНІ

(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК.

(56) WO0001815 A, 13.01.2000.

WO9943813 A, 02.09.99.

US5770577 A, 23.07.98.

BALOH R. H. ET AL: "ARTEMIN, A NOVEL MEMBER OF THE GDNF LIGAND FAMILY, SUPPORTS PERIPHERAL AND CENTRAL NEURONS AND SIGNALS THROUGH THE GFRALPHA3- RET RECEPTOR COMPLEX" NEURON, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 21, no. 6, 1998, pages 1291-1302.

BALOH R. H. ET AL: "Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 5, 4 February 2000, pages 3412-3420.

DELGADO C. ET AL: "THE USES AND PROPERTIES OF PEG-LINKED PROTEINS" CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, XX, XX, vol. 9, no. 3/4, 1992, pages 249-304.

FRANCIS G. E. ET AL: "PEGYLATION OF CYTOKINES AND OTHER THERAPEUTIC PROTEINS AND PEPTIDES: THE IMPORTANCE OF BIOLOGICAL OPTIMISATION OF COUPLING TECHNIQUES" INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 68, no. 1, 1998, pages 1-18.

REDDY K. R: "CONTROLLED-RELEASE, PEGYLATION, LIPOSOMAL FORMULATIONS: NEW MECHANISMS IN THE DELIVERY OF INJECTABLE DRUGS" ANNALS OF PHARMACOTHERAPY, XX, XX, vol. 34, no. 7/8, 2000, pages 915-923.

(57) 1. Поліпептид, який містить амінокислотну послідовність щонайменше на 90 % ідентичну амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1, де поліпептид включає амінокислоту, що відрізняється від аспа-

рагіну, у положенні, яке відповідає положенню 95 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, при цьому амінокислота, яка замінена у положенні, що відповідає положенню 95, вводить сайт, у якому з поліпептидом може бути зв'язаний поліалкіленгліколь.

2. Поліпептид за п.1, в якому амінокислота в положенні, яке відповідає положенню 95 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, є лізином.

3. Поліпептид за пп.1 або 2, де поліпептид містить послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(а) амінокислот 8-94 і 96-113 SEQ ID NO: 2;

(б) амінокислот 8-94 і 96-113 SEQ ID NO: 3; і

(с) амінокислот 8-94 і 96-113 SEQ ID NO: 4.

4. Поліпептид за п. 1, що містить амінокислоти 1-94 і 96-113 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4, де лізин замінений аспарагіном в положенні 95.

5. Поліпептид за пп. 1 або 2, де амінокислотна послідовність щонайменше на 95 % ідентична амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1.

6. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, де вказаний поліпептид у випадку димеризації характеризується щонайменше однією біологічною активністю, вибраною з групи, що складається з:

(а) зв'язування з GFR $\alpha$ 3;

(б) стимулювання фосфорилування тирозину поліпептиду RET;

(с) підвищення життєздатності нейрона; і

(д) нормалізації патологічних змін нейрона.

7. Злитий білок, що містить поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, злитий з другим компонентом.

8. Злитий білок за п. 7, де другим компонентом є поліпептид сироваткового альбуміну людини.

9. Нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид за будь-яким з пп. 1-6 або злитий білок за пп. 7 або 8.

10. Вектор, що містить нуклеїнову кислоту за п. 9.

11. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 10.

12. Клітина-хазяїн за п.11, де клітиною-хазяїном є клітина яєчника китайського хом'ячка.

13. Спосіб одержання поліпептиду за будь-яким з пп. 1-6 або злитого білка за пп. 7 або 8, що включає:

а. культивування клітини-хазяїна за п. 11 або 12 в умовах, які забезпечують експресію поліпептиду за будь-яким з пп. 1-6 або злитого білка за пп. 7 або 8, і

(13) C2

(11) 82983

(19) UA

b. одержання вказаного поліпептиду або злитого білка.

14. Димер, який містить два поліпептиди за будь-яким з пп. 1-6 або два злитих білка за пп. 7 або 8.

15. Кон'югат, який містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-6, кон'югований з поліалкіленгліколем, де поліалкіленгліколь кон'югований з поліпептидом, в якому амінокислота замінена в положенні, яке відповідає положенню 95 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1.

16. Кон'югат, який містить злитий білок за пп. 7 або 8, кон'югований з поліалкіленгліколем, де поліалкіленгліколь кон'югований із злитим білком, в якому амінокислота замінена в положенні, яке відповідає положенню 95 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1.

17. Кон'югат за пп. 15 або 16, де поліалкіленгліколь є поліетиленгліколь.

18. Кон'югат за будь-яким з пп. 15-17, де поліпептид глікозилований.

19. Фармацевтична композиція, що містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-6, злитий білок за пп. 7 або 8 або кон'югат за будь-яким з пп. 15-18, і фізіологічно прийнятний наповнювач.

20. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-6, злитий білок за пп. 7 або 8 або кон'югат за будь-яким з пп. 15-18 для застосування у терапії.

21. Застосування поліпептиду за будь-яким з пп. 1-6, злитого білка за пп. 7 або 8 або кон'югата за будь-яким з пп. 15-18, для приготування лікарського засобу для лікування або профілактики захворювання або розладу нервової системи.

22. Застосування за п. 21, де захворюванням або розладом є периферична невропатія або синдром невропатичного болю.

Винахід, загалом, відноситься до поліпептидів і більш конкретно до модифікованих нейротрофічних поліпептидів і способів застосування вказаних модифікованих поліпептидів.

Нейротрофічні фактори є білками природного походження, які підвищують життєздатність, підтримують фенотипічне диференціювання, запобігають дегенерації та підвищують активність нервових клітин і тканин. Нейротрофічні фактори виділяють з нервової тканини і з нервової тканини, яка іннервована нервовою системою, та поділяють на функціонально і структурно споріднені групи, які також називаються сімействами, суперсімействами або підсімействами. Серед суперсімейств нейротрофічних факторів є суперсімейства фактора росту фібробластів, нейротрофіну і трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Окремі види нейротрофічних факторів відрізняються за своєю фізичною структурою, їх взаємодією із спорідненими їм рецепторами та їх впливами на різні типи нервових клітин. До суперсімейства TGF- $\beta$  відносять ліганди, подібні до нейротрофічного фактора, одержаного з лінії гліальних клітин, (GDNF), які включають GDNF, персефін (PSP) і нейртурин (NTN).

Ліганди підсімейства GDNF володіють спільною здатністю індукувати передачу сигналу за допомогою тирозинкінази рецептора RET. Три вказаних ліганди підсімейства GDNF відрізняються за їх відносними афінітетами відносно сімейства нейротрофічних рецепторів, рецепторів GFR $\alpha$ .

Нещодавно описаним нейротрофічним фактором є «нейбластин» або «NBN». Нейбластин відносять до підсімейства GDNF, оскільки він має спільні ділянки гомології з іншими GDNF-лігандами і за його здатністю зв'язуватися та активувати RET. На відміну від інших GDNF-лігандів нейбластин є високо вибірково відносно комплексу GFR $\alpha$ S-рецептор RET. Крім того, NBN містить унікальні підділянки у своїй амінокислотній послідовності.

На жаль нейбластин зазнає швидкого кліренсу в організмі. Вказаний швидкий кліренс може пере-

шкоджати використанню нейбластину у терапевтичних застосуваннях. Таким чином, існує необхідність в ідентифікації варіантів нейбластину, які мають підвищену біодоступність.

Даний винахід частково базується на відкритті нових форм нейбластину, які виявляють підвищені фармакокінетичні властивості і біодоступність *in vivo*. Вказані нові форми включають варіантні поліпептиди нейбластину, кон'юговані з полімерними молекулами.

В одному аспекті відмітною ознакою винаходу є варіантний поліпептид нейбластину або мутеїн поліпептиду нейбластину, що містить амінокислотну послідовність, яка має одну або декілька амінокислотних заміни у положеннях зрілого димеру нейбластину, що експонуються у розчинник. Дані заміни вводять у нативний поліпептид нейбластину один або декілька сайтів, в яких з поліпептидом можуть бути зв'язані такі речовини, як ті, що мають природне походження або синтетичні полімери, для того, щоб збільшити його розчинність і, отже, його біодоступність *in vivo*. Переважно дані варіантні поліпептиди містять амінокислотну послідовність, щонайменше, на 70% ідентичну амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1. Варіантний поліпептид нейбластину включає одну або декілька амінокислотних заміни, при яких у положенні 14 в амінокислотній послідовності варіантного поліпептиду знаходиться амінокислота, що відрізняється від аргініну, у положенні 39 амінокислотної послідовності варіантного поліпептиду знаходиться амінокислота, що відрізняється від аргініну, у положенні 68 варіантного поліпептиду знаходиться амінокислота, що відрізняється від аргініну, або у положенні 95 варіантного поліпептиду знаходиться амінокислота, що відрізняється від аспарагіну, у тому випадку, коли положення амінокислот пронумеровані відповідно до поліпептидної послідовності SEQ ID NO: 1.

«Нейбластин дикого типу» або «wt-NBN» у значенні, що використовується у даному описі, відноситься до послідовності поліпептиду нейбластину, яка має природне походження або є натив-

ною, такого як нейбластин щура, миші або людини (дивись, наприклад, SEQ ID NO: 2, 3 або 4). Конкретні варіантні поліпептиди нейбластину називаються у даному описі «NBN- $X_1N_1X_2$ » або « $X_1N_1X_2$ -NBN», де  $X_1$  відноситься до амінокислоти поліпептиду нейбластину дикого типу,  $N_1$  відноситься до номера положення амінокислоти  $X_1$  у послідовності, яке нумерується відповідно до SEQ ID NO: 1.  $X_2$  відноситься до амінокислоти, що замінює амінокислоту дикого типу у вказаному пронумерованому положенні у послідовності. Таким чином, наприклад, NBN-N95K означає варіантні поліпептиди нейбластину, в яких аспарагін у положенні 95 замінений лізином.

Варіантний поліпептид нейбластину може бути одержаний у вигляді мультимерного поліпептиду. Наприклад, варіантний поліпептид нейбластину може бути одержаний у вигляді димеру, який містить, щонайменше, один варіантний поліпептид нейбластину. У деяких випадках димер є гомодимером варіантного поліпептиду нейбластину. В інших випадках димер є гетеродимером, який містить один варіантний поліпептид нейбластину і один поліпептид нейбластину дикого типу. Інші димери можуть містити дві різні варіантні форми поліпептиду нейбластину.

У деяких варіантах варіантний поліпептид нейбластину крім амінокислот 8-113 містить амінокислоти 1-7 SEQ ID NO: 1.

У переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину при димеризації зв'язує GFR $\alpha$ 3. У додаткових переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину при димеризації стимулює фосфорилування тирозину поліпептиду RET, або сам по собі, або у випадку зв'язування з GFR $\alpha$ 3.

В інших переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину при димеризації підвищує життєздатність нейрона, наприклад, підвищує життєздатність чутливого нейрона.

В інших переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину при димеризації нормалізує патологічні зміни нейрона, такого як чутливий нейрон.

У наступних переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину при димеризації підвищує життєздатність нейрона, наприклад, автономного нейрона або допамінергічного нейрона.

У деяких варіантах варіантний поліпептид містить дві, три або більше амінокислотних замін, вибраних з групи, яка складається з амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 14 амінокислотної послідовності варіантного поліпептиду, амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 39 амінокислотної послідовності варіантного поліпептиду, амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 68 варіантного поліпептиду та амінокислоти, що відрізняється від аспарагіну, у положенні 95 варіантного поліпептиду.

У переважних варіантах амінокислотою в одному або декількох положеннях 14, 39, 68 і 95 є лізин.

Переважно амінокислоти 8-94 і 96-113 варіантного поліпептиду нейбластину, щонайменше, на 90% ідентичні амінокислотам 8-94 і 96-113 SEQ ID NO: 1. Більш переважно послідовності амінокислот ідентичні, щонайменше, на 95%. Найбільш пере-

важно амінокислотна послідовність варіантного поліпептиду нейбластину містить амінокислотну послідовність поліпептиду нейбластину щура, людини або миші природного походження у положеннях амінокислот 8-94 і 96-113 варіантного поліпептиду нейбластину. Наприклад, амінокислоти 8-94 і 96-113 варіантного поліпептиду нейбластину можуть містити амінокислотну послідовність амінокислот 8-94 і 96-113 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4.

Також винахід відноситься до злитого білка або поліпептиду, який включає в себе варіантний поліпептид нейбластину або поліпептид нейбластину дикого типу, або білка, який є димером двох злитих білків нейбластину. Злиті білки нейбластину також володіють посиленими фармакокінетичними властивостями і підвищеною біодоступністю *in vivo*.

В іншому аспекті винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує варіантний поліпептид нейбластину. Нуклеїнова кислота, яка кодує варіантний поліпептид нейбластину, переважно приготувана у векторі, наприклад, в експресуючому векторі. Нуклеїнова кислота варіантного нейбластину або вектор, який її містить, можуть бути надані у клітині. Клітина може являти собою, наприклад, клітину ссавця, клітину гриба, дріжджову клітину, клітину комахи або бактеріальну клітину. Переважною клітиною ссавця є клітина яєчника китайського хом'ячка («клітина CHO»).

Винахід також відноситься до способу одержання варіантного поліпептиду нейбластину за допомогою культивування клітини, яка містить нуклеїнову кислоту, що кодує варіантний нейбластин, в умовах, які забезпечують експресію варіантного поліпептиду нейбластину. За бажанням варіантний поліпептид нейбластину потім можна дістати. Винахід, крім того, включає варіантний поліпептид нейбластину, що продукується клітиною. Подібні нуклеїнові кислоти, вектори, клітинні хазяї та способи одержання поліпептидів представлені у даному описі для злитих білків (таких як злиті білки нейбластин-сироватковий альбумін) відповідно до даного винаходу.

Винахід також відноситься до композиції, яка містить поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину, зв'язаний з полімером неприродного походження. Варіантний поліпептид нейбластину у композиції переважно містить амінокислотну послідовність, щонайменше, на 70% ідентичну амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1, за умови, що варіантний поліпептид нейбластину містить одну або декілька амінокислотних замін, вибраних з групи, яка складається з амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 14 амінокислотної послідовності варіантного поліпептиду, амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 39 амінокислотної послідовності варіантного поліпептиду, амінокислоти, що відрізняється від аргініну, у положенні 68 варіантного поліпептиду та амінокислоти, що відрізняється від аспарагіну, у положенні 95 варіантного поліпептиду, при цьому положення амінокислот пронумеровані відповідно до поліпептидної послідовності SEQ ID NO: 1.

У переважних варіантах полімер містить компонент, представлений поліалкіленгліколем, наприклад поліетиленгліколевий компонент (ПЕГ).

У переважних варіантах поліалкіленгліколевий компонент зв'язаний з аміногрупою поліпептиду нейбластину або лізином у варіантному поліпептиді нейбластину.

Зв'язування може здійснюватися за допомогою активованого складного ефіру N-гідроксилсукциніміду (NHS). Активований складний ефір може являти собою, наприклад, сукцинімідилсукцинат (SS-ПЕГ), сукцинімідилбутират (SPB-ПЕГ), або сукцинімідилпропіонат (SPA-ПЕГ) ПЕГ.

Поліалкіленгліколевий компонент може, наприклад, являтися собою карбоксиметил-NHS, норлейцин-NHS, SC-ПЕГ, трезилат, альдегід, епоксид, карбонілімідазол або карбонат PNP.

У деяких варіантах поліалкіленгліколевий компонент зв'язаний з групою цистеїну поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину. Наприклад, зв'язування може здійснюватися за допомогою малеїмідної групи, вінілсульфонової групи, галогенацетатної групи та тіольної групи.

У деяких варіантах поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину у композиції глікозильований. У тому випадку, коли поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид глікозильований, полімер може бути зв'язаний з вуглеводним компонентом глікозильованого поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину. Наприклад, полімер може бути зв'язаний з глікозильованим поліпептидом нейбластину або варіантним поліпептидом нейбластину після окислення групи підрозолу або аміногрупи глікозильованого поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, або окислення реакційно-здатної групи полімеру.

У різних варіантах поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину містить один, два, три або чотири ПЕГ-компоненти.

У переважних варіантах поліпептид нейбластину, варіантний поліпептид нейбластину або кон'югат з полімером має більш тривалий час напівжиття у сироватці у порівнянні з часом напівжиття поліпептиду або варіантного поліпептиду за відсутності полімеру.

У переважних варіантах поліпептид нейбластину, варіантний поліпептид нейбластину або кон'югат з полімером у комплексі володіє фізіологічною активністю, вибраною з групи, яка складається з: зв'язування GFR $\alpha$ 3, активації RET, нормалізації патологічних змін нейрона або підвищення життєздатності нейрона.

Під «нормалізацією патологічних змін нейрона» мають на увазі, що даний кон'югат індукує зміну одного або декількох з наступних параметрів клітини: рівня експресії структурного білка, рецептора нейротрофічного фактора, іонного каналу або нейромедіатора, або індукує зміну морфології клітини, у кожному випадку так, що значною мірою відновлює такий параметр до його рівня у нейроні такого ж або подібного фенотипу, який не порушений захворюванням, дегенерацією, інсультом або пошкодженням. Нормалізацію патологічних змін нейрона можна контролювати імуногістохімічно

або шляхом оцінки змін рівнів клітинних продуктів, що секретуються або виділяються, або за допомогою оцінки змін *in vivo* у виявленні, фізіологічно властивому функції ураженого нейрона(нів). Наприклад, у випадку патологічних змін, зв'язаних з синдромом невропатичного болю, контролюють такі виявлення болю, як гіперальгезію, гіпоальгезію або алодинію.

Під «підвищеною життєздатністю нейрона» мають на увазі продовжене виживання ураженого нейрона понад період життєздатності, що спостерігається у відповідному нейроні, ураженому тим же типом захворювання, розладу, інсульту або пошкодження, але не обробленому кон'югатом нейбластину або злитим білком відповідно до винаходу.

У деяких варіантах полімер зв'язаний з поліпептидом у сайті нейбластину, який є N-кінцем. У деяких варіантах полімер зв'язаний з поліпептидом у сайті у некінцевій амінокислоті поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину.

У переважних варіантах полімер зв'язаний з амінокислотою поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, яка експонується у розчинник.

У переважних варіантах полімер зв'язаний з поліпептидом нейбластину або варіантним поліпептидом нейбластину біля залишку, вибраного з групи, яка складається з амінокінцевої амінокислоти варіантного поліпептиду, положення 14 в амінокислотній послідовності поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, положення 39 в амінокислотній послідовності поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, положення 68 в амінокислотній послідовності поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину і положення 95 в амінокислотній послідовності поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка включає фізіологічно прийнятний наповнювач, що містить або має диспергований у ньому поліпептид нейбластину, варіантний поліпептид нейбластину або кон'югат відповідно до даного винаходу.

У наступному аспекті винахід включає стабільний водорозчинний кон'югований комплекс поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, що містить поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину, зв'язаний з поліетиленгліколевим компонентом, в якому поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину зв'язаний з поліетиленгліколевим компонентом за допомогою лабільного зв'язку. У деяких варіантах лабільний зв'язок розщеплюється при біохімічному гідролізі, протеолізі або сульфгідрильному розщепленні. У переважних варіантах лабільний зв'язок розщеплюється в умовах *in vivo*.

Винахід також відноситься до способу одержання модифікованого поліпептиду нейбластину, який володіє пролонгованою активністю *in vivo* або *in vivo* у порівнянні з нейбластином дикого типу, шляхом приготування поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину і зв'язування поліпептиду або модифікованого варіантно-

го поліпептиду нейбластину з полімерним компонентом неприродного походження з утворенням таким чином композиції поліпептиду нейбластину, зв'язаного з полімером.

У наступному аспекті винахід відноситься до способу лікування або профілактики порушення нервової системи у суб'єкта (такого як людина) за допомогою введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично ефективною кількістю варіантного поліпептиду нейбластину, композиції, що містить поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину, зв'язаний з полімером, або комплексу, який включає в себе стабільний водорозчинний кон'югований комплекс поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду, що містить поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину, зв'язаний з поліетиленгліколевим компонентом.

Переважаю розладом нервової системи є розлад периферичної нервової системи, такий як периферична невропатія або синдром невропатичного болю. Переважними суб'єктами для лікування є люди.

Введення може бути, наприклад, системним або локальним.

Якщо не обумовлено особливо, всі технічні і наукові терміни, що використовуються у даному описі, мають таке ж значення, яке звичайно мається на увазі фахівцем в області, до якої відноситься даний винахід. Хоча на практиці або при тестуванні даного винаходу можна використовувати способи і речовини, подібні або еквівалентні приведеним у даному описі, придатні способи і речовини описані нижче. Всі публікації, заявки на видачу патентів, патенти та інші джерела інформації, які згадуються у даному описі, включені у вигляді посилання у повному обсязі. У випадку конфліктної ситуації даний опис, включаючи визначення, буде перевіреним. Крім того, матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не розглядаються як такі, що обмежують.

Інші відмітні ознаки і переваги винаходу стануть зрозумілими з наступного докладного опису і формули винаходу.

Винахід відноситься до нових варіантних поліпептидів нейбластину, які можуть бути модифіко-

вані для того, щоб посилити їх фармакокінетичні властивості і підвищити біодоступність. Переважні варіантні поліпептиди нейбластину мають змінені амінокислотні послідовності, які полегшують зв'язування з полімерним агентом, таким як полімер поліалкіленгліколю.

Варіантні поліпептиди нейбластину

Винахід відноситься до поліпептидів нейбластину, які мають варіантні амінокислотні послідовності у порівнянні з послідовністю поліпептиду нейбластину дикого типу. Амінокислотні послідовності поліпептидів нейбластину людини і миші описані у [WO 00/01815]. Приклади варіантних поліпептидів нейбластину відповідно до винаходу представлені у таблиці 1.

Переважаю змінені залишки у варіантному поліпептиді нейбластину вибрані для забезпечення зв'язування полімеру, такого як полімер поліалкіленгліколю, у положенні модифікованої амінокислоти. Переважними сайтами модифікації поліпептиду нейбластину є сайти у доступних для розчинника ділянках поліпептиду нейбластину. Такі сайти можна вибрати на основі перегляду кристалічної структури спорідненого нейротрофічного фактора, GDNF, кристалічна структура якого описана у [Nat. Struct. Biol. 4: 435-38, 1997]. Сайти також можна вибрати на основі структурно-функціональної інформації, одержаної для химерних білків персефін/нейбластин. Вказані химери описані у [J. Biol. Chem. 275: 3412-20, 2000]. Приблизний список доступних для розчинника або експонованих на поверхні амінокислот нейбластину, ідентифікованих за допомогою вказаної методики, вказаний у таблиці 2.

Винахід включає варіантний поліпептид нейбластину, що містить амінокислотну послідовність, яка, щонайменше, на 70% ідентична амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1, що показана у таблиці 1. У деяких варіантах один або декілька аргінінів у положенні 14, положенні 39, положенні 68 або аспарагін у положенні 95 амінокислотної послідовності поліпептиду замінюють амінокислотою, що відрізняється від аргініну або аспарагіну. Переважаю амінокислоту дикого типу замінюють лізином або цистеїном.

Таблиця 1

```
AGGPGSRARAAGARGCRLRSQVLPVVRALGLGHRSDLVRF людина
AGTRSSRARTTDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF миша
AGTRSSRARATDARGCRLRSQVLPVSALGLGHSSDELIRF щур
ag----srar-argcrlrsqvlpv-alglgh--sdel-rf консенсус
```

```
RFCSGSCRRARSPHDLASLLGAGALRPPGSRPVSQPC людина
RFCSGSCRRARSPHDLASLLGAGALRPPGSRPISQPC миша
```

RFCSGSCRRARSPHDLASLLGAGALASPPGSRPISQPC шур

rfcsgscrrars-hdlslasllgagalr-ppgsrp-sqpc консенсус

CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAACGCLG  
CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATAACGCLG  
CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDHLSATAACGCLG

людина (SEQ ID NO:2)  
миша (SEQ ID NO:3)  
шур (SEQ ID NO:4)

crptryeavsfmdvnstwrtvd-lsatagclg

консенсус (SEQ ID NO:1)

Консенсуальна послідовність:

Ala Gly Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Ser Arg Ala Arg Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Ala Arg Gly Cys  
Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Xaa<sub>7</sub> Ala Leu Gly Leu Gly His Xaa<sub>8</sub> Ser  
Asp Glu Leu Xaa<sub>9</sub> Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg  
Ser Xaa<sub>10</sub> His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg  
Xaa<sub>11</sub> Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa<sub>12</sub> Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg  
Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp  
Xaa<sub>13</sub> Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly

де

Xaa <sub>1</sub>	є	Gly	або	Thr
Xaa <sub>2</sub>	є	Pro	або	Arg
Xaa <sub>3</sub>	є	Gly	або	Ser
Xaa <sub>4</sub>	є	Ala	або	Thr
Xaa <sub>5</sub>	є	Ala	або	Thr
Xaa <sub>6</sub>	є	Gly	або	Asp
Xaa <sub>7</sub>	є	Arg	або	Ser
Xaa <sub>8</sub>	є	Arg	або	Ser
Xaa <sub>9</sub>	є	Val	або	Ile
Xaa <sub>10</sub>	є	Pro	або	Gln
Xaa <sub>11</sub>	є	Pro	або	Ser
Xaa <sub>12</sub>	є	Val	або	Ile
Xaa <sub>13</sub>	є	Arg	або	His

У таблиці 2 представлений список залишків та їх номери у нейбластині людини, які ймовірно є такими, що експонуються на поверхні. Залишки, що експонуються на поверхні, визначали за допомогою оцінки структури димеру GDNF щура, утвореного ланцюгами А і В (PDB код 1AGQ), і визначення того, чи присутній залишок на поверхні

структури. Потім дану структуру порівнювали з вирівнюванням послідовностей GDNF і нейбластину у [Baloh et al., Neuron, vol.21, p.1291, 1998], щоб визначити придатні залишки у нейбластині. Схема нумерації являє собою схему, показану у таблиці 1.

Таблиця 2

1 Ala n/a	8 Ala n/a	16 Cys -	24 Pro +	32 His +	40 Phe -
2 Gly n/a	9 Arg n/a	17 Arg +	25 Val -	33 Arg +	41 Arg +
3 Gly n/a	10 Ala n/a	18 Leu +	26 Arg +	34 Ser -	42 Phe +
4 Pro n/a	11 Ala n/a	19 Arg +	27 Ala +	35 Asp +	43 Cys -
5 Gly n/a	12 Gly +	20 Ser +	28 Leu -	36 Glu +	44 Ser +
6 Ser n/a	13 Ala -	21 Gln +	29 Gly +	37 Leu +	45 Gly +
7 Arg n/a	14 Arg +	22 Leu +	30 Leu +	38 Val -	46 Ser +
	15 Gly +	23 Val -	31 Gly +	39 Arg +	47 Cys -
48 Arg +	106 Ala-				
49 Arg +	107 Thr +				
50 Ala -	108 Ala +				
51 Arg +	109 Cys -				
52 Ser +	110 Gly +				
53 Pro +	111 Cys -				
54 His -	112 Leu +				
55 Asp -	113 Gly				
56 Leu +	n/a				
57 Ser -					
58 Leu -					
59 Ala +					
60 Ser +					
61 Leu -					
62 Leu +					
63 Gly +					
64 Ala +					
65 Gly +					
66 Ala +					
67 Leu -					
68 Arg n/a					
69 Pro n/a					
70 Pro n/a					
71 Pro n/a					
72 Gly +					
73 Ser +					
74 Arg n/a					
75 Pro n/a					
76 Val -					
77 Ser -					
78 Gln +					
79 Pro -					
80 Cys -					
81 Cys -					
82 Arg -					
83 Pro -					
84 Thr +					
85 Arg +					
86 Tyr +					
87 Glu +					
88 Ala +					
89 Val +					
90 Ser +					
91 Phe -					
92 Met +					
93 Asp +					
94 Val +					
95 Asn +					
96 Ser +					
97 Thr +					
98 Trp +					
99 Arg +					
100 Thr +					
101 Val -					
102 Asp +					
103 Arg +					
104 Leu -					
105 Ser-					

n/a вказує, що залишки не присутні у структурі GDNF. Це відбувається або внаслідок дизайну конструкції, пнучких ділянок, або вставок у нейбластині у порівнянні з GDNF (залишки 68-71):

- вказує, що залишки приховані і не розташовані на поверхні або є залишками цистеїну, залученими до дисульфідного зв'язку. Оскільки даний білок є цисте-

йовим вузлом, величезна кількість залишків розташована на поверхні.  
+ вказує, що даний залишок у структурі GDNF експонований на поверхні, і таким чином ймовірно експонований на поверхні нейбластину, хоча петля, що містить залишки 66-75, спостерігається тільки в одному з мономерів GDNF (ймовірно гнучкому). Вказана петля також містить вставку з 4 залишків у нейбластині у порівнянні з GDNF.

У значенні, що використовується у даному описі, терміни «ідентичність» або «гомологічний», або «гомологія» використовуються взаємозамінно і відносяться до подібності послідовностей між двома поліпептидами, молекулами або між двома нуклеїновими кислотами. У тому випадку, коли положення в обох порівнюваних послідовностях зайняте однією і тією ж основою або мономерною амінокислотою субдиницею (наприклад, якщо положення у кожній з двох молекул ДНК зайняте аденіном або положення у кожному з двох поліпептидів зайняте лізином), то відповідні молекули є гомологічними по даному положенню. Процент гомології між двома послідовностями є функцією кількості співпадаючих або гомологічних положень, що є у двох послідовностях, розділеної на кількість порівнюваних положень,  $\times 100$ . Наприклад, якщо 6 з 10 положень у двох послідовностях співпадають або є гомологічними, то дві послідовності гомологічні на 60%. Як приклад послідовності ДНК CTGACT і CAGGTT володіють 50% гомологією (3 із загальної кількості 6 положень співпадають). Звичайно порівняння виконують у тому випадку, коли дві послідовності вирівнюють, щоб одержати максимальну гомологію. Таке вирівнювання можна здійснити, використовуючи, наприклад, спосіб [Needleman et al., J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)], що для зручності виконується за допомогою комп'ютерних програм, таких як програма Align (DNASTar, Inc.). «Подібними» послідовностями є послідовності, які при вирівнюванні мають ідентичні або подібні амінокислотні залишки, де подібні залишки є консервативними замінами або «допустимими точковими мутаціями» відповідних амінокислотних залишків у вирівняній еталонній послідовності. У цьому відношенні «консервативна заміна» залишку в еталонній послідовності є заміною залишком, який фізично або функціонально подібний до відповідного еталонного залишку, наприклад, який має подібний розмір, форму, електричний заряд, хімічні властивості, включаючи здатність утворювати ковалентні або водневі зв'язки, або тому подібне. Таким чином, «варіантною послідовністю з консервативними замінами» є послідовність, яка відрізняється від еталонної послідовності або послідовності дикого типу тим, що у ній присутня одна або декілька консервативних заміन або допустимих точкових мутацій.

У переважних варіантах поліпептид відповідно до винаходу на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% або 99% ідентичний амінокислотам 8-113 SEQ ID NO: 1. У деяких варіантах амінокислотна послідовність варіантного поліпептиду нейбластину містить послідовність амінокислот поліпептиду нейбластину щура, людини або миші природного походження у положеннях амінокислот 1-94 і 96-113 варіантного поліпептиду нейбластину, наприклад, поліпептид має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, 3 або 4 у вказаних положеннях.

Варіантний поліпептид нейбластину, який відрізняється за послідовністю від поліпептидів, описаних у SEQ ID NO: 1-4, може містити одну або декілька консервативних амінокислотних заміни. Альтернативно або додатково варіантний поліпептид нейбластину може відрізнятися однією або декількома неконсервативними амінокислотними замінами або делеціями, або інсерціями. Переважно заміни, інсерції або делеції не порушують біологічну активність виділеного білка.

Консервативні заміни звичайно включають заміну однієї кислоти іншою з подібними характеристиками, такі як заміни у межах наступних груп: валін, аланін і гліцин; лейцин, валін та ізолейцин; аспарагінова кислота і глутамінова кислота; аспарагін і глутамін; серин, цистеїн і треонін; лізин та аргінін; і фенілаланін і тирозин. Неполарні гідрофобні амінокислоти включають аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан і метіонін. Полярні нейтральні амінокислоти включають гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін і глутамін. Позитивно заряджені (основні) амінокислоти включають аргінін, лізин і гістидин. Негативно заряджені (кислі) амінокислоти включають аспарагінову кислоту і глутамінову кислоту. Будь-яку заміну одного представника вказаної вище групи полярних, основних або кислих амінокислот іншим представником тієї ж групи можна вважати консервативною заміною.

Інші заміни легко можуть ідентифікувати фахівці у даній області. Наприклад, у випадку амінокислоти аланіну заміна може бути вибрана з будь-якої заміни D-аланіном, гліцином, бета-аланіном, L-цистеїном і D-цистеїном. У випадку лізину заміною може бути будь-яка з амінокислот: D-лізин, аргінін, D-аргінін, гомо-аргінін, метіонін, D-метіонін, орнітин або D-орнітин. Як правило, замінами у функціонально важливих ділянках, які ймовірно можуть індукувати зміни властивостей ізольованих поліпептидів, є заміни, при яких: (i) полярний залишок, наприклад, серин або треонін, замінює гідрофобний залишок, наприклад, лейцин, ізолейцин, фенілаланін або аланін (або замінюється ними); (ii) залишок цистеїну замінює будь-який інший залишок (або замінюється ним); (iii) залишок, що має електропозитивний бічний ланцюг, наприклад, лізин, аргінін або гістидин, замінює залишок, що має електронегативний бічний ланцюг, наприклад, глутамінову кислоту або аспарагінову кислоту (або замінюється ними); або (iv) залишок, що має великий бічний ланцюг, наприклад, фенілаланін, замінює залишок, що не має такого бічного ланцюга, наприклад, гліцин (або замінюється ним). Ймовірність того, що одна із згаданих вище неконсервативних заміни може змінити функціональні властивості білка, також корелює з положенням заміни по відношенню до функціонально важливих ділянок білка: отже, деякі неконсервативні заміни можуть



здійснювати невеликий або не здійснювати впливу на біологічні властивості.

Винахід також відноситься до мультимерних поліпептидів, які містять варіантний поліпептид нейбластину. Мультимерні поліпептиди переважно готують у вигляді очищених мультимерних поліпептидів. Приклади мультимерних комплексів включають, наприклад, димерні комплекси. Мультимерний комплекс можна одержати у вигляді гетеромерного або гомомерного комплексу. Таким чином, мультимерний комплекс може бути гетеродимерним комплексом, що включає один варіантний поліпептид нейбластину і один неваріантний нейбластин, або гетеродимерним комплексом, що включає два або більше варіантних поліпептидів нейбластину.

У деяких варіантах варіантний поліпептид нейбластину зв'язує GFR $\alpha$ 3. Переважно зв'язування варіантного поліпептиду нейбластину стимулює фосфорилування поліпептиду RET. Щоб визначити, чи зв'язує поліпептид GFR $\alpha$ 3, можна провести аналіз, як описано у [WO 00/01815]. Наприклад, присутність нейбластину у середовищі у надосадах лінії клітин CHO можна описати з використанням модифікованої форми аналізу потрійного комплексу, описаного [Sanicola et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 6238)]. У даному аналізі можна оцінити GDNF-подібні молекули відносно їх здатності опосередковувати зв'язування між позаклітинним доменом RET і різними корецепторами, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 і GFR $\alpha$ 3. Розчинні форми RET і корецептори створюють у вигляді злитих білків. Описаний злитий білок між позаклітинним доменом RET щура і плацентарною лужною фосфатазою (RET-AP) і злитий білок між позаклітинним доменом GFR $\alpha$ -1 щура [описаний в опублікованій заявці W09744356; 27 листопада 1997, включеної у даний опис у вигляді посилання] і Fc-доменом IgG1 людини rGFR( $\alpha$ 1-Ig) [Sanicola et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 6238].

У деяких варіантах варіантний поліпептид нейбластину підвищує життєздатність нейрона або нормалізує патологічні зміни нейрона або і те і інше. Аналізи для визначення того, чи підвищує поліпептид життєздатність нейрона або нормалізує патологічні зміни нейрона, описані, наприклад, у [WO 00/01815]. Переважно нейрон є чутливим нейроном, автономним нейроном або допамінергічним нейроном.

Синтез і виділення варіантних поліпептидів нейбластину

Варіантні поліпептиди нейбластину можна виділити, використовуючи способи, відомі у даній області. Поліпептиди нейбластину природного походження можна виділити з клітин або тканинних джерел відповідно до придатної схеми очищення з використанням стандартних способів очищення білка. Альтернативно варіантні поліпептиди нейбластину можна синтезувати хімічно, використовуючи стандартні способи синтезу пептидів. Синтез коротких амінокислотних послідовностей добре розроблений в області пептидів. Дивись, наприклад, [Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis (2d ed., 1984)].

В іншому варіанті варіантні поліпептиди нейбластину одержують способами на основі рекомбі-

нантної ДНК. Наприклад, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує варіантний поліпептид нейбластину, можна вбудувати у вектор, наприклад, вектор, який експресує, і нуклеїнову кислоту можна ввести у клітину. Відповідні клітини включають, наприклад, клітини ссавців (такі як клітини людини або клітини яєчника китайського хом'ячка), клітини грибів, дріжджові клітини, клітини комах і бактеріальні клітини. При експресії у рекомбінантній клітині клітину переважно культують в умовах, що забезпечують експресію варіантного поліпептиду нейбластину. Варіантний поліпептид нейбластину за бажанням можна дістати з клітинної суспензії. Термін «дістати» означає, що варіантний поліпептид видаляють з тих компонентів клітини або культурального середовища, в яких він присутній до діставання. Спосіб діставання може включати одну або декілька стадій згортання білка або очищення.

Варіантні поліпептиди нейбластину можна сконструювати, використовуючи будь-який з декількох способів, відомих у даній області. Одним з таких способів є сайт-специфічний мутагенез, при якому змінюють конкретний нуклеотид (або за бажанням невелику кількість конкретних нуклеотидів) для того, щоб змінити одну амінокислоту (або за бажанням невелику кількість заздалегідь визначених амінокислотних залишків) у поліпептиді, що кодується, нейбластину. Фахівцям у даній області зрозуміло, що сайт-специфічний мутагенез є звичайним способом, який широко використовується. Насправді велика кількість наборів для сайт-специфічного мутагенезу комерційно доступна. Одним з таких наборів є «набір для сайт-специфічного мутагенезу, що трансформує», який продається Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.).

При здійсненні даного винаходу на практиці, якщо не обумовлено особливо, будуть використані звичайні способи клітинної біології, культивування клітин, молекулярної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК, хімії білків та імунології, які відомі фахівцям у даній області. Такі способи описані у літературі. Дивись, наприклад, [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover, ed), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (M. J. Gait, ed.), 1984; патент США No. 4683195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Haines and S. J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B. D. Haines and S. J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (13. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986].

Варіантні злиті білки нейбластину

За необхідності варіантний поліпептид нейбластину можна приготувати у вигляді злитого білка. Злиті поліпептидні похідні білків відповідно до винаходу також містять різні структурні форми первинного білка, які зберігають біологічну активність. «Злиття» у значенні, що використовується у даному описі, відноситься до колінеарного ковалентного зв'язку двох або більше білків або їх фрагментів між їх окремими пептидними кістками, найбільш переважно за допомогою генетичної експресії молекули полінуклеотиду, що кодує дані білки в одній і тій же рамці зчитування (тобто, «у рамці»). Переважно, щоб білки або їх фрагменти були з різних джерел. Таким чином, переважні злиті білки включають варіантний білок нейбластину або фрагмент, ковалентно зв'язаний з другим компонентом, який не є варіантним нейбластином. Переважно другий компонент одержують з поліпептиду, який існує у вигляді мономеру і достатній для того, щоб додати властивості підвищеної розчинності і/або біодоступності поліпептиду нейбластину.

Наприклад, «злиття варіантний нейбластин/сироватковий альбумін людини» є білком, що містить варіантний поліпептид нейбластину відповідно до винаходу або його фрагмент, N-кінець або C-кінець якого зв'язаний у рамці з поліпептидом сироваткового альбуміну людини [дивись Syed et al, Blood, 1997, 89: 3243 і Yeh et al., P.N.A.S. USA 1992, 89: 1904 і патенти США No. 5876969 і 5302697]. Термін «злитий білок» крім того включає в себе варіантний нейбластин, хімічно зв'язаний за допомогою моно- або гетерофункціональної молекули з другим компонентом, який не є варіантним білком нейбластину і одержаний de novo з очищеного білка, як описано нижче.

Злиття нейбластин-сироватковий альбумін можна сконструювати з використанням способів, відомих у даній області. Будь-який з ряду перехресно зшивальних агентів, який містить відповідну групу, що реагує з аміногрупою, або групу, що реагує з тіолом, можна використовувати для зв'язування нейбластину з сироватковим альбуміном. Приклади придатних лінкерів включають перехресно зшивальні агенти, реакційно-здатні по відношенню до аміну, які вбудовують малеїмід, що реагує з тіолом. Вказані лінкери включають, наприклад, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS або GMBS. Інші придатні лінкери вбудовують групу галогенацетату, яка реагує з тіолом. Вказані лінкери включають, наприклад, SBAP, SIA, SIAB, а лінкери, які надають захищений або незахищений тіол для реакції з сульфгідрильними групами, щоб одержати зв'язок, який відновлюється, включають SPDP, SMPT, SATA або SATP, всі з яких є комерційно доступними (наприклад, Pierce Chemicals). Фахівець у даній області може подібним чином представити альтернативні методики, які дозволять зв'язати N-кінець нейбластину з сироватковим альбуміном.

Також передбачається, що фахівець у даній області може створити кон'югати з сироватковим альбуміном, для яких N-кінець NBN або тіольний компонент сироваткового альбуміну не є мішенню. За бажанням злиття NBN-сироватковий альбумін можна створити з використанням способів генети-

чної інженерії, при яких NBN зливають з геном сироваткового альбуміну на його N-кінці, C-кінці або на обох кінцях.

Крім того, передбачається, що з використанням подібної методики можна створити будь-який кон'югат NBN, результатом якого є продукт з пролонгованим часом напівжиття у тварин (включаючи людину).

Інші похідні варіантних нейбластинів включають ковалентно зв'язані або агреговані кон'югати варіантного нейбластину або його фрагментів з іншими білками або поліпептидами, наприклад, шляхом синтезу у рекомбінантній культурі у вигляді додаткових N-кінців або C-кінців. Наприклад, кон'югований пептид може являти собою сигнальну (або лідерну) поліпептидну послідовність у N-кінцевій ділянці білка, яка котрансляційно або посттрансляційно керує перенесенням білка від місця його синтезу до місця його функціонування з внутрішньої або зовнішньої сторони клітинної мембрани або стінки (наприклад, лідер альфа-фактора дріжджів). Рецепторні білки нейбластину можуть містити пептиди, що додаються для покращення очищення або ідентифікації нейбластину (наприклад, злиття гістидин/нейбластин). Амінокислотна послідовність нейбластину також може бути зв'язана з пептидом Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) [Hopp et al., Biotechnology 6: 1204, 1988]. Остання послідовність є високо антигенною і дає епітоп, який оборотно зв'язується специфічним моноклональним антитілом, що забезпечує швидкий аналіз і просте очищення експресованого рекомбінантного білка.

Вказана послідовність також специфічно відщеплюється ентерокиназою слизової оболонки бика біля залишку, що безпосередньо слідує за парною Asp-Lys.

Варіантні поліпептиди нейбластину. кон'юговані з полімером

За необхідності можна використовувати одну молекулу полімеру для кон'югування з поліпептидом нейбластину, хоча також припускається, що можна також зв'язувати декілька молекул полімеру. Композиції кон'югованого нейбластину відповідно до винаходу можна використовувати для застосувань як *in vivo*, так і не *in vivo*. Крім того, буде зрозуміло, що у полімері, який кон'югується, можна використовувати будь-які інші групи, компоненти або інші кон'юговані види, які підходять для кінцевого застосування. Як приклад при деяких застосуваннях корисним може бути ковалентне зв'язування з полімером функціонального компонента, який додає полімеру стійкість до деградації УФ або антиоксидантні або інші властивості або характеристики. Як наступний приклад при деяких застосуваннях може бути корисною функціоналізація полімеру для того, щоб зробити його реакційно-здатним або особливо здатним до перехресного зшивання, щоб посилити різні властивості або характеристики кон'югованого матеріалу загалом. Таким чином, полімер може містити будь-яку функціональну групу, групи, що повторюються, зв'язки або інші складові структури, які не заважають ефективності композиції кон'югованого мутеїну нейбластину при одержанні планованого результату.

Ілюстративні полімери, які можна успішно використовувати для одержання вказаних необхідних характеристик, приведені у даному описі нижче у типових схемах реакцій. У випадку застосувань ковалентно зв'язаного пептиду полімер може бути функціоналізований і потім зв'язаний з вільною амінокислотою(ами) пептиду(дів) з утворенням лабільних зв'язків.

У деяких варіантах поліпептид нейбластину зв'язують з полімером за допомогою кінцевої реакційно-здатної групи поліпептиду. Альтернативно або додатково поліпептид нейбластину можна зв'язати через аміногрупу бічного ланцюга внутрішнього залишку лізину, наприклад, залишку лізину, введеного в амінокислотну послідовність поліпептиду нейбластину природного походження. Таким чином, кон'югати також можуть бути розгалуженими від некінцевих реакційно-здатних груп. Полімер з реакційно-здатною групою(ами) у даному описі називають «активованим полімером». Реакційно-здатна група вибірково реагує з вільною аміногрупою або іншими реакційно-здатними групами білка.

Зв'язування активованого полімеру може відбуватися біля будь-якої доступної аміногрупи нейбластину, такої як альфа-аміногрупа або епсилон-аміногрупа залишку лізину або залишків, введених в амінокислотну послідовність поліпептиду нейбластину або його варіанту. Вільні карбоксильні групи, відповідним чином активовані карбонільні групи, гідроксил, гуанідил, імідазол, окислені вуглеводні компоненти і меркаптогрупи нейбластину (якщо вони є) також можна використовувати як місця зв'язування.

Звичайно використовують приблизно від 1,0 до 10 моль активованого полімеру на моль білка в залежності від концентрації білка. Кінцева кількість являє собою баланс між максимізацією ступеня реакції при мінімізації неспецифічних модифікацій продукту і в той же час визначенням хімічних складів, які будуть підтримувати оптимальну активність, одночасно з оптимізацією, якщо це можливо, часу напівжиття білка. Переважно зберігається, щонайменше, приблизно 50% біологічної активності білка і найбільш переважно зберігається близько 100%.

Реакції можна здійснювати будь-яким відповідним способом, що використовується для здійснення реакцій біологічно активних речовин з інертними полімерами, переважно приблизно при pH 5-8, наприклад, pH 5, 6, 7 або 8, у тому випадку, якщо реакційно-здатні групи являють собою альфа-аміногрупу на N-кінці. Загалом, спосіб полягає в одержанні активованого полімеру і потім здійсненні реакції білка з активованим полімером, щоб одержати розчинний білок, придатний для композиції. Вказану вище реакцію модифікації можна здійснити декількома способами, які можуть включати одну або декілька стадій.

Полімер можна зв'язати з варіантним поліпептидом нейбластину з використанням способів, відомих у даній області. Наприклад, в одному варіанті поліалкіленгліколевий компонент зв'язують з групою лізину поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину. Зв'язування з групою лізину можна здійснити з використанням

активованого складного ефіру N-гідроксилсукциніміду (NHS), такого як сукцинімідилсукцинат (SS-PEG) і сукцинімідилпропіонат (SPA-PEG) ПЕГ. Відповідні поліалкіленгліколеві компоненти включають, наприклад, карбоксиметил-NHS, норлейцин-NHS, SC-ПЕГ, трезилат, альдегід, епоксид, карбонілімідазол і карбонат PNP.

Сукцинімідоловий компонент може бути замінений додатковими реагуючими з аміном лінкерами ПЕГ. Вказані лінкери включають, наприклад, ізотіоціанати, нітрофенілкарбонати, епоксиди і карбонати бензотриазолу. Переважно вибирають умови, щоб максимізувати вибірковість і ступінь реакції. Можна використовувати лінійні та розгалужені форми ПЕГ, а також інші форми алкілу. Довжина ПЕГ може варіювати. Розмір найбільш звичайних форм варіює від 2 кД до 100 кД. Поряд з тим, що у даних прикладах повідомляється, що цілеспрямоване пегілювання на N-кінці не впливає на фармакокінетичні властивості, той факт, що речовина зберігала фізіологічну функцію, свідчить про те, що модифікація у сайті або сайтах, вказаних у даному описі, не здійснює негативного впливу. Тому при створенні мутантних форм NBN, які можуть забезпечувати додаткові сайти зв'язування, за допомогою інсерції залишків лізину, вважається допустимим, що можливим результатом буде те, що вказані форми можуть бути пегільвані як біля лізину, так і на N-кінці.

За необхідності варіантні поліпептиди нейбластину можуть містити мітку, наприклад, мітку, яку згодом можна вивільнити за допомогою протеолізу. Таким чином, представлений лізіном компонент можна вибірково модифікувати спочатку внаслідок реакції варіанту, що містить his-мітку, з лінкером з низькою молекулярною масою, таким як реагент Траута (Pierce), який буде реагувати як з лізином, так і з N-кінцем, і потім вивільняючи his-мітку. Потім поліпептид буде містити вільну SH-групу, яку можна вибірково модифікувати ПЕГ, що містить реагуючу з тіолом головну групу, таку як група maleїмїду, вінілсульфонова група, галогенацетатна група або вільна або захищена група SH.

Реагент Траута можна замінити будь-яким лінкером, який буде забезпечувати специфічний сайт для зв'язування ПЕГ. Як приклад реагент Траута можна замінити SPDP, SMPT, SATA або SATP (всі доступні з Pierce). Подібним чином можна здійснювати реакцію білка з реакційно-здатним по відношенню до аміну лінкером, який вбудовує maleїмід (наприклад, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS або GMBS), галогенацетатну групу (SBAP, SIA, SIAB) або вінілсульфову групу, і здійснювати реакцію одержаного у результаті продукту з ПЕГ, який містить вільну SH. Єдине обмеження розміру лінкеру, який використовують, полягає у тому, щоб він не міг блокувати подальше видалення N-кінцевої мітки.

Таким чином, в інших варіантах поліалкіленгліколевий компонент зв'язують з групою цистеїну поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину. Зв'язування можна здійснити, наприклад, з використанням maleїмідної групи, вінілсульфонової групи, галогенацетатної групи і тіольної групи.

З полімером може бути зв'язаний один або декілька сайтів варіантного поліпептиду нейбластину. Наприклад, з полімером можуть бути зв'язані один, два, три, чотири або п'ять ПЕГ-компонентів. У деяких варіантах ПЕГ-компонент зв'язують з амінокінцем і/або амінокислотами 14, 39, 68 і 95 поліпептиду нейбластину, пронумерованими, як описано у таблиці 1.

У переважних варіантах варіантний поліпептид нейбластину у композиції має більш тривалий час напівжиття у сироватці у порівнянні з часом напівжиття варіантного поліпептиду за відсутності полімеру. Альтернативно або додатково варіантний поліпептид нейбластину у композиції зв'язує GFRA3, активує RET, нормалізує патологічні зміни нейрона або підвищує життєздатність нейрона або виконує комбінацію вказаних фізіологічних функцій.

У переважних варіантах композицію готують у вигляді стабільного водорозчинного кон'югованого комплексу поліпептиду нейбластину або варіантного поліпептиду нейбластину, що містить поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину, зв'язаний з поліетиленгліколевим компонентом. За бажанням поліпептид нейбластину або варіантний поліпептид нейбластину можна зв'язати з поліетиленгліколевим компонентом за допомогою лабільного зв'язку. Лабільний зв'язок можна розщепити, наприклад, при біохімічному гідролізі, протеолізі або сульфгідрильному розщепленні. Наприклад, зв'язок можна розщепити в умовах *in vivo* (фізіологічних умовах).

Фармацевтичні композиції, що містять кон'югати варіантний нейбластин-полімер

Також представлена фармацевтична композиція, що містить кон'югат варіантний нейбластин-полімер відповідно до даного винаходу. «Фармацевтичну композицію» у значенні, що використовується у даному описі, визначають як композицію, яка містить білок або кон'югат нейбластину відповідно до винаходу, диспергований у фізіологічно прийнятному наповнювачі, яка необов'язково містить один або декілька інших фізіологічно сумісних інгредієнтів. Таким чином, фармацевтична композиція може містити ексципієнт, такий як вода, одну або декілька неорганічних речовин, цукрів, детергентів і один або декілька носіїв, таких як інертний білок (наприклад, гепарин або альбумін).

Кон'югати полімер-нейбластин відповідно до винаходу можна вводити як такі, а також у формі їх фармацевтично прийнятних складних ефірів, солей та інших фізіологічно функціональних похідних. У таких фармацевтичних і лікарських композиціях кон'югат варіантного нейбластину переважно використовують разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями і необов'язково будь-якими іншими терапевтичними інгредієнтами.

Носій(і) повинен бути фармацевтично прийнятним у значенні сумісності з іншими інгредієнтами композиції і не бути занадто небезпечним для реципієнта. Варіантний нейбластин вводять у кількості, ефективній для досягнення необхідної фармакологічної дії або корисного лікарського ефекту, які описані у даній заявці, і у кількості, придатній для

досягнення необхідної біодоступної дози або концентрації *in vivo*.

Композиції включають композиції, придатні для парентерального, а також для непарентерального введення, і конкретні способи введення включають пероральне, ректальне, трансбукальне, місцеве, назальне, очне, підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне, трансдермальне, інтратекальне, внутрішньосуглобове, внутрішньо-артеріальне, підарахноїдальне, бронхіальне, лімфатичне, вагінальне та внутрішньоматкове введення. Переважні композиції, придатні для аерозольного і парентерального введення, як локально, так і системно.

У тому випадку, коли варіантний нейбластин використовують у композиції, яка містить рідкий розчин, композицію переважно можна вводити перорально, бронхіально або парентерально. У випадку використання нейбластину у рідкій суспензійній композиції або у вигляді порошку у біосумісній композиції носія, композицію переважно можна вводити перорально, ректально або бронхіально. Альтернативно її можна вводити назально або бронхіально за допомогою розпилення порошку у газі-носії, щоб утворити газоподібну дисперсію порошку, який вдихає пацієнт з дихального контуру, що містить відповідний пристрій для розпилення.

Композиції, які містять білки відповідно до даного винаходу, зручно можуть бути представлені у дозованих лікарських формах і можуть бути приготовані будь-яким із способів, добре відомих в області фармації. Такі способи, як правило, включають стадію введення активного інгредієнта(тів) в асоціацію з носієм, до складу якого входить один або декілька додаткових інгредієнтів.

Звичайно композиції готують шляхом одержання однорідної і тісної асоціації активного інгредієнта(тів) і рідкого носія, тонко диспергованого твердого носія або обох носіїв і потім за необхідності, формуванням продукту у вигляді дозованих форм необхідної композиції.

Композиції відповідно до даного винаходу, придатні для перорального введення, можуть бути представлені у вигляді дискретних одиниць, таких як капсули, облатки, таблетки або пастилки, кожна з яких містить заздалегідь визначену кількість активного інгредієнта у вигляді порошку або гранул; або у вигляді суспензії у водному розчині або неводному розчині, такої як сироп, еліксир, емульсія або рідкі ліки, що дозуються.

Композиції, придатні для парентерального введення, для зручності містять стерильний водний препарат активного кон'югата, який переважно є ізотонічним крові реципієнта (наприклад, фізіологічний розчин солі). Такі композиції можуть містити агенти, що суспендують, і загусники або інші системи мікрочастинок, які розроблені для цілеспрямованої доставки сполуки до компонентів крові або одного або декількох органів. Композиції можуть бути представлені у формі одноразової дози або у формі багаторазових доз.

Композиції назального спрею містять очищені водні розчини активного кон'югата з консервантами і агентами для ізотонічності. Такі композиції

переважно доводять до рН та ізотонічного стану, сумісного з мембранами слизової оболонки носа.

Композиції для ректального введення можуть бути представлені у вигляді супозиторія з відповідним носієм, таким як олія какао, гідрогенізовані жири або гідрогенізована жирна карбонова кислота. Очні композиції, такі як очні краплі, готують способом, подібним до способу одержання назального спрею, за винятком того, що рН і фактори для ізотонічності переважно доводять так, щоб вони підходили для ока.

Місцеві композиції містять кон'югати відповідно до винаходу, розчинені або суспендовані в одному або декількох середовищах, таких як мінеральне масло, гас, багатоатомні спирти або інші основи, що використовуються для місцевих фармацевтичних композицій.

Крім вказаних вище інгредієнтів композиції відповідно до даного винаходу можуть додатково містити один або декілька допоміжних інгредієнтів, вибраних з розріджувачів, буферів, коригентів, агентів, що дезінтегрують, поверхнево-активних речовин, загусників, речовин, що ковзають, консервантів (включаючи антиоксиданти) і тому подібного. Вказані вище міркування також застосовні до злитих білків нейбластину відповідно до винаходу (наприклад, злиття нейбластин-HSA).

Таким чином, даний винахід охоплює одержання придатних злитих білків для стабілізації кон'югата варіантного нейбластину у розчині *in vitro* як переважне ілюстративне застосування винаходу. Злиті білки можна використовувати, наприклад, для того, щоб підвищити стійкість варіантного поліпептиду нейбластину до деградації ферментами і надати способи підвищення терміну зберігання, стабільності при кімнатній температурі і тому подібного. Зрозуміло, що вказані вище міркування також застосовні до злитих білків нейбластин-сироватковий альбумін (включаючи злиті білки нейбластин людини-сироватковий альбумін людини) відповідно до винаходу.

#### Способи лікування

Варіантні поліпептиди нейбластину, а також їх злиті білки або кон'югати можна використовувати для лікування або ослаблення розладу або захворювання в організмі існуючих тварин, переважно ссавця, більш переважно примата, включаючи людину, коли вказаний розлад або захворювання піддається впливу активності нейротрофічних агентів.

Композиції відповідно до винаходу можна використовувати безпосередньо, наприклад, за допомогою фармацевтичних композицій, які ін'єкують, проковтують або імплантують для лікування патологічного процесу, що відповідає на поліпептиди нейбластину. Композиції можна використовувати для ослаблення розладу або захворювання в організмі існуючих тварин, включаючи людину, коли розлад або захворювання піддається впливу активності нейротрофічних агентів. Розладом або захворюванням, зокрема, може бути пошкодження нервової системи, викликане травмою, хірургічною операцією, ішемією, інфекцією, метаболічними захворюваннями, недостатністю харчування, зловласним новоутворенням або токсичними агентами, і генетичними або ідіопатичними процесами.

Пошкодження, зокрема, може відбутися у чутливих нейронах або клітинах ретинального ганглія, включаючи нейрони у гангліях дорзальних корінців спинного мозку, або у будь-якій з наступних тканин: ганглії колінця, позачерепний ганглії і вузлуватий ганглії; присінково-завитковий комплекс восьмого черепно-мозкового нерва; вентролатеральний полюс верхньощелепової-нижньощелепової частки трійчастого ганглія; і мезенцефалічне ядро трійчастого нерва.

У переважному варіанті способу відповідно до винаходу захворюванням або розладом є нейродегенеративне захворювання, до якого залучені пошкоджені і травмовані нейрони, а саме травматичні пошкодження периферичних нервів, довгастого мозку і/або спинного мозку, пошкодження нейронів при церебральній ішемії, невротатія і особливо периферична невротатія, травма або пошкодження периферичного нерва, ішемічний інсульт, гостре пошкодження головного мозку, гостре пошкодження спинного мозку, пухлини нервової системи, множинний склероз, вплив нейротоксинів, метаболічні захворювання, такі як діабет або дисфункція нирок, і пошкодження, викликане інфекційними агентами, нейродегенеративні розлади, що включають хворобу Альцгеймера, хворобу Хантінгтона, хворобу Паркінсона, синдроми з виявленнями хвороби Паркінсона, супрануклеарний параліч, що прогресує (синдром Стіла-Річардсона-Ольшевського), оливо-пonto-церебелярну дегенерацію (ОПЦД), синдром Шая-Дрейджера (множинна системна атрофія), комплекс деменція-паркінсонізм (Гуам-тип), бічний аміотрофічний склероз, або будь-яке інше природжене або нейродегенеративне захворювання, і погіршення пам'яті, зв'язане з деменцією.

У переважному варіанті можна лікувати чутливі нейрони і/або нейрони автономних систем. Зокрема, можна лікувати ноцицептивні та механорецептивні нейрони, більш конкретно нейрони з дельта-волокнами і С-волокнами. Крім того, можна лікувати симпатичні і парасимпатичні нейрони автономної системи.

В іншому переважному варіанті можна лікувати захворювання мотонейронів, такі як бічний аміотрофічний склероз («БАС») і спінальна аміотрофія. У ще одному переважному варіанті молекули нейбластину відповідно до даного винаходу можна використовувати для прискорення відновлення нервів після травматичного ураження. Альтернативно або додатково у приведених у даному описі способах можна використовувати канал керування нервом за допомогою матриксу, що містить варіантні поліпептиди нейбластину або злиття або кон'югати варіантних поліпептидів нейбластину. Такі канали керування нервами заявлені, наприклад, у [патенті США No. 5834029], включеному у даний опис у вигляді посилання.

У переважному варіанті вказані у даному описі композиції (і фармацевтичні композиції, які їх містять) використовують для лікування периферичних невротатій. Серед периферичних невротатій, які передбачається лікувати молекулами відповідно до даного винаходу, знаходяться індуковані травмами невротатії, наприклад, такі, які викликані фізичним пошкодженням або патологічним ста-

ном, фізичне пошкодження головного мозку, фізичне пошкодження спинного мозку, інсульт, зв'язаний з пошкодженням головного мозку, і неврологічні порушення, зв'язані з нейродегенерацією. Також включені у даний винахід невропатії, які є вторинними після інфекції, впливу токсину і впливів лікарського засобу. Крім того, у даний винахід включені невропатії, які є вторинними після системного або метаболічного захворювання. Заявлені у даному описі композиції також можна використовувати для лікування невропатій, індукованих хіміотерапією (таких як невропатії, викликані надходженням хемотерапевтичних засобів, наприклад, таксолу або цисплатину); невропатій, індукованих токсинами, невропатій, індукованих лікарськими засобами, невропатій, індукованих недовітністю вітамінів; ідіопатичних невропатій; та діабетичних невропатій. Дивись, наприклад, [патенти США 5496804 і 5916555], кожний з яких включений тут у вигляді посилання.

Додатковими станами, які можна лікувати з використанням приведених у даному описі композицій, є мононевропатії, множинні мононевропатії і поліневропатії, включаючи аксональну невропатію і невропатію, що димієлінізує, з використанням вказаних у даному описі композицій.

В іншому переважному варіанті композиції відповідно до винаходу (і фармацевтичні композиції, які їх містять) використовують для лікування різних захворювань ока, включаючи руйнування фоторецепторів сітківки у пацієнтів, які страждають дегенерацією жовтої плями, пігментним ретинітом, глаукомою та подібними захворюваннями.

Винахід буде далі ілюстрований наступними необмежувальними прикладами.

Приклад 1 - Біодоступність пегільованого на N-кінці нейбластину

Виявили, що одержаний у клітинах CHO рекомбінантний нейбластин людини зазнає швидкого кліренсу з циркуляції у випадку внутрішньовенного введення щурам. Після підшкірного введення не виявляли білка у сироватці. Щоб підвищити біодоступність нейбластину конструювали пегільовані форми.

Оскільки у послідовності NBN не зустрічаються лізини, то результатом специфічних відносно аміну хімічних реакцій пегілювання буде пегілювання поліпептиду NBN по його амінокінцю. Отже, для кожного димеру нейбластину необхідно зв'язати два ПЕГ-компоненти. Таким чином, спочатку безпосередньою мішенню ПЕГ-форм був N-кінець за рахунок специфічних відносно аміну хімічних реакцій. Несподівано навіть пегілювання двома зв'язаними ПЕГ з М.м. 20кД було мало корисним відносно часу напівжиття, що свідчить про те, що механізм, який лежить в основі шляху кліренсу,

домінував над збільшенням часу напівжиття, якого очікували при пегілюванні.

Приклад 2 - Конструювання пегільованого мутеїну нейбластину N95K

Потім визначали біодоступність мутантних форм NBN, пегільованих по внутрішніх амінокислотних залишках. Конструювали серію з чотирьох мутантів із замінами залишків природного походження у положеннях 14, 39, 68 і 95, щоб вбудувати лізин у вибрані місця у послідовності. Вказані лізини могли б забезпечувати альтернативні сайти для зв'язування ПЕГ. Вказані сайти вибирали з використанням кристалічної структури GDNF [Nat. Struct. Biol. 4: 435-8, 1997] як основи для ідентифікації поверхневих залишків і мутагенного дослідження химери персефін/нейбластин [J. Biol. Chem. 275: 3412-20, 2000], щоб ідентифікувати функціонально важливі ділянки структури, які не треба зачіпати.

Дві мутації (R39 і R68) були цілеспрямовано введені у ділянку, яка на основі розподілу позитивних зарядів на поверхні, може являти собою сайт зв'язування гепарину, властивість білка, яка ймовірно здійснює внесок в його швидкий кліренс. Третій сайт був цілеспрямовано введений у N95, сайт природного глікозилювання NBN дикого типу. Даний сайт модифікується у природних умовах складною вуглеводною структурою. Таким чином, очікувалося, що ПЕГ-модифікація у вказаному сайті не порушить функцію. Четвертий сайт (R14) вибрали у ділянці, що не містить яких-небудь інших модифікацій. Для вказаних у даному описі досліджень вибрали мутант, в якому залишок аспарагіну у положенні 95 замінювали лізином («мутант N95K»).

Конструювали чотири різних мутеїни нейбластину щура, що містять одну або декілька змін у послідовності поліпептиду нейбластину щура дикого типу. Мутеїни включають мутеїн N95K з однією зміною і мутеїни, що містять одиничні заміни в інших сайтах амінокислотної послідовності нейбластину щура: R14K; R68K і R39K. У номенклатурі «X<sub>1</sub>N<sub>1</sub>X<sub>2</sub>» X<sub>1</sub> відноситься до амінокислоти поліпептиду нейбластину дикого типу, N<sub>1</sub> відноситься до номеру положення амінокислоти X<sub>1</sub> у послідовності, яка пронумерована відповідно до SEQ ID NO: 1. X<sub>2</sub> відноситься до амінокислоти, яка заміщує амінокислоту дикого типу у вказаному пронумерованому положенні послідовності.

Щоб сконструювати мутацію нейбластину N95K, здійснювали сайт-специфічний мутагенез у pCMB020, плазміді, що кодує нейбластин щура дикого типу. Нуклеотидна послідовність нейбластину дикого типу і амінокислотна послідовність поліпептиду, що кодується нею, представлені нижче:

1 ATGGAATCGG GACTTGGAGA GCTACTGCA TTGTCCACT GCCTCGGCC  
 51 TAGGTGCGAA CCAGCCTTGT GGCACACCT AGCTGCTTA GCCTGCTGA  
 101 GCAGCGTCAC AGAGCTTCC CTGGACCAA TGTCCCGCAG CCCCCTCTT  
 151 CCGGATGTC CCTCGCGGT CTTGGCGCC CCAACAGACT ACCTACCTGG  
 201 GGGACACACC GCACATCTGT GCAGCGAAG AGCCTGCGA CCACGCGCC  
 251 AGTCTCTCA GCGCGACCC CCACACCGG GTCCCGGCT CCACTCTCT  
 301 CCGCTGCGC TCGCGGGG ACCTCGCGG CTTGACAGAA CCGGAGCAG  
 351 CCGCGACCG GCTACAGAT CCGCGGCTG CCGCTGCGC TCACAGCTG  
 401 TCGCGGTAG CACTCTCGC CTGGGCGACA GCTCGACGA GCTGATACG  
 451 TTCCGCTTCT GCAGCGTTC GTGCGCGCA GCACGCTCC CACCGATCT  
 501 CAGCTTGGC AGCTGCTGG GCGCGGGG CTTGGGTCT CTTCCCGGT  
 551 CCGCGCGAT CAGCGAGCC TTGTGCGG CACTCGCTA TGAGGAGTC  
 601 TCTTCTATG ACCTGAACG CACCTGAGA ACCGTGAGC ATCTCTCGC  
 651 CACCGCTGC GGTGTCTGG GCTGA (SEQ ID NO:5)  
 1 MELQLGEPTA LSHCLRPRWQ PALNPTLAL ALLSSVTEAS LDPMSRSPAS  
 51 RLVSPVLAP PTDFPGHT AHLCSERLR PFPQSPQAP PFPGLQSP  
 101 PALRGARAA RAGTSSRAR ATDARGCLR SQLVPVSLA LGHSSDLIR  
 151 FRFCGSCRR ARSPHDLIA SLGAGALS PFGSRPISQ CCRPTRYAV  
 201 SPMDVSTWR TVDHLATAC GCLG\* (SEQ ID NO:4)

Мутагенез рСМ020 з використанням олігонуклеотидів KD2-310 і KD3-211 приводив до утворення плазмиди рСМ027:

KD2-310 5'-  
 GTATCTTTCATGGACGTAAGTCTACATGGAGAA  
 CCGTAGATCATCTATCTCCAACC-3' (SEQ ID NO: 6)

KD2-311 5'-  
 GGTTGCAGATAGATGATCTACGGTTCTCCATGTA  
 GACTTTACGTCCATGAAAGATAC-3' (SEQ ID NO: 7)

У рСМ027, кодон, що кодує аспарагін у положенні 95, замінили кодоном, який кодує лізин.

Мутеїн нейбластину R14K утворювали заміною кодону, що кодує аргінін, у положенні 14 послідовності рСМ020, яка кодує нейбластин, кодоном, що кодує лізин. Сайт-специфічний мутагенез здійснювали у рСМ020 з використанням олігонуклеотидів KD3-254 і KD3-255:

KD3-254 5'-  
 GCTGGAACCTCGCAGCTCTCGTCTCGTGCAACG  
 GATGCAAAAGGCTGTGCG-3' (SEQ ID NO: 8)

KD2-255 5'-  
 CGACAGCCTTTTGCATCCGTTGCACGAGCAGAG  
 AGCTGCGAGTTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 9)

Одержана у результаті конструкція була названа рСМ029.

Мутеїн нейбластину R68K утворювали заміною кодону, що кодує аргінін, у положенні 68 послідовності рСМ020, яка кодує нейбластин, кодоном, що кодує лізин. Сайт-специфічний мутагенез здійснювали у рСМ020 з використанням олігонуклеотидів KD3-258 і KD3-259:

KD3-258 5'-  
 GGAGCCGGAGCACTAAATCTCCCCGGGATCTA  
 GACC-3' (SEQ ID NO: 10)

KD3-259 5'-  
 GGTCTAGATCCCCGGGGGAGATTCTAGTGCTCCG  
 GCTCC-3' (SEQ ID NO: 11)

Одержана у результаті конструкція була названа рСМ030.

Мутеїн нейбластину R39K утворювали заміною аргініну лізином у положенні амінокислоти 39 послідовності рСМ020, яка кодує нейбластин. Сайт-специфічний мутагенез рСМ020 здійснювали з використанням олігонуклеотидів KD3-256 і KD3-257:

KD3-256 5'-  
 GACGAATTAATTAAGTTTCGTTTTTGTTCAGG-3'  
 (SEQ ID NO: 12)

KD3-257 5'-  
 CCTGAACAAAAACGAACTTAATTAATTCGTC-3'  
 (SEQ ID NO: 13)

Для експресії і очищення плазмиду, яка кодує мутеїн NBN N95K щура, експресували в *E. coli* у вигляді міченого His злитого білка з сайтом розщеплення ентерокіназою, що безпосередньо прилягав до початку послідовності зрілого 113-амінокислотного NBN. *E. coli* вирощували у ферментері об'ємом 500 л і готували заморожену клітинну масу. Клітини *E. coli* лізували у прес-фільтрі Manton Gaulin, і NBN NK щурів діставали з нерозчинної промитої фракції осаду.

NBN екстрагували з осаду гуанідинхлоридом, піддавали згортання і his-мітку видаляли ентерокіназою. Потім продукт піддавали хроматографії на Ni NTA-агарозі (Qiagen) та на катіонообмінній смолі WP CBX Bakerbond.

Оброблення ентерокіназою his-міченого продукту приводило до аберантного розщеплення білка біля аргініну у положенні 7 зрілої послідовності. Одержаний у результаті продукт des-1-7-NBN був повністю активним в ELISA KIRA і структурно не відрізнявся від зрілої форми за своєю чутливістю до індукованої гуанідином денатурації і тому був використаний для подальшої роботи.

NBN N95K щура пегілювали у середньому 3,3 ПЕГ-компонентів/молекулу, використовуючи як реагент метоксиполі(етиленгліколь)сукцинімідилпропіонат (SPA-ПЕГ) з молекулярною масою 10000Д. Одержаний у результаті пегілюваний продукт всебічно характеризували, включаючи аналіз за допомогою електрофорезу у SDS-ПААГ, ексклюзійну хроматографію по розміру (SEC), обернено-фазову ВЕРХ, мас-спектрометрію з лазерною десорбцією/іонізацією з матриці (MALDI/MS), картування пептидів, оцінку активності в ELISA KIRA і визначення вмісту ендотоксину. Чистота продукту NBN N95K перед пегілюванням, виміряна за допомогою SDS-ПААГ і SEC, складала більше 95%. Продукт NBN N95K в умовах, які не відновлюють, мігував у вигляді димеру, що відповідало його розрахованій структурі. Після пегілювання одержаний продукт складався з серії модифікованих аддуктів, що містять 2ПЕГ/молекулу - 5% продукту, 3ПЕГ/молекулу - 60% продукту, 4ПЕГ/молекулу - 30% продукту і декілька мінорних форм більш високої маси. У пегілюваному зразку не було ознак агрегатів. Залишкові рівні немодифікованого NBN у продукті були нижче меж кількісного вимірювання. Вміст ендотоксину у матеріалі звичайно складає менше 1ЕУ/мг. Питома активність пегілюваного NBN в ELISA KIRA складає 10нМ. Пегілюваний продукт готували при концентрації 1,1мг/мл у PBS, pH 6,5.

Матеріал, який за ефективністю подібний до NBN дикого типу, можна постачати у вигляді замороженого розчину, який зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Мутейні R14K, R39K і R68K експресували в *E. coli* і їх можна піддавати таким же способом очищення, пегілювання та оцінки функції, які описані вище для N95K-NBN.

Приготування пегілюваного NBN

230мл підданого згортанню NBN N95K щура (2,6мг/мл), який одержували в *E. coli* і зберігали при  $4^{\circ}\text{C}$  в 5мМ фосфаті натрію, pH 6,5, 100мМ NaCl, розбавляли 77мл води, 14,4мл 1М NEPES, pH 7,5 і 2,8г (кінцева концентрація 10мг/мл) ПЕГ SPA, 10000Д (Shearwater Polymers, Inc.). Зразок інкубували при кімнатній температурі протягом 4 годин у темряві, потім обробляли 5мМ імідазолу (кінцева концентрація), фільтрували і зберігали протягом ночі при  $4^{\circ}\text{C}$ . Продукт готували у двох партіях, одна з яких містила 130мл NBN N95K по об'єму, а інша містила об'єм 100мл. Пегілюваний NBN очищали від реакційної суміші на колонці Fractogel EMD  $\text{SO}_3^-$  (M) (EM Industries). Розгонку на колонці проводили при кімнатній температурі. Всі буфери готували апірогенно. До реакційної суміші додавали хлорид натрію до кінцевої концентрації 87мМ і зразок наносили на колонку Fractogel об'ємом 45мл (внутрішній діаметр 5см).

Колонку промивали одним об'ємом колонки 5мМ фосфату натрію, pH 6,5, 80мМ NaCl, потім трьома аліквотами об'ємом, що дорівнює об'єму колонки, 5мМ фосфату натрію, який містить 50мМ NaCl. Смола переносили на колонку діаметром 2,5см і пегілюваний NBN елюювали з колонки шістьма аліквотами об'ємом по десять мл, які містять 5мМ фосфат натрію, pH 6,5, 400мМ NaCl, трьома аліквотами, що містять 500мМ NaCl, і шістьма аліквотами, які містять 600мМ NaCl. Елюювані фракції аналізували відносно вмісту білка по оптичній щільності при 280нм і потім відносно ступеня модифікації за допомогою електрофорезу в SDS-ПААГ. Вибрані фракції об'єднували, фільтрували через фільтр з діаметром пор 0,2мкм і розбавляли водою до 1,1мг пегілюваного NBN щурів/мл. Після оцінки рівнів ендотоксину в окремих партіях їх об'єднували і повторно фільтрували через 0,2мкм-мембрану. Кінцеву речовину ділили на аліквоти і зберігали при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

УФ-спектр очищеного пегілюваного NBN NK

УФ-спектр (240-340нм) пегілюваного NBN NK вимірювали на чистому зразку. Зразок аналізували у трьох повторях. Пегілюваний зразок виявляв максимум поглинання при 275-277нм і мінімум поглинання при 247-249нм. Одержаний результат узгоджується з результатом, який спостерігається у випадку немодифікованої проміжної сполуки основної маси NBN. Концентрацію білка пегілюваного продукту оцінювали на основі спектра, використовуючи коефіцієнт екстинкції  $\Sigma_{280}^{0,1\%} = 0,50$ . Концентрація білка основної маси пегілюваного NBN складала 1,1мг/мл. У зразку не було каламутності, що очевидно, виходячи з відсутності поглинання при 320нм.

Характеристика пегілюваного NBN NK за допомогою електрофорезу в SDS-ПААГ

Аліквоти пегілюваного NBN, що містять 3; 1,5; 0,75 і 0,3мкг продукту, піддавали аналізу у SDS-

ПААГ в 4-20% градієнтному гелі (Owl). Гель забарвлювали Кумасі яскраво-синім R-250. Паралельно розганяли маркери молекулярної маси (GIBCO-BRL).

Аналіз у SDS-ПААГ пегілюваного NBN NK в умовах, що не відновлюють, виявив серію смуг, які відповідають модифікаціям 2, 3, 4 і більше 4ПЕГ/молекулу. Основна смуга з видимою масою 98кД містить 3ПЕГ/молекулу. В очищеному пегілюваному продукті немодифікований NBN не виявляли. Наявність суміші продуктів з 2, 3 і 4 зв'язаними ПЕГ підтверджували за допомогою MALDI-мас-спектрометричного аналізу. Співвідношення продуктів, які містять 2, 3 і 4ПЕГ, визначали за допомогою денситометрії і встановили, що воно дорівнює 7, 62 і 30 процентів від сумарної кількості, відповідно.

Характеристика пегілюваного NBN за допомогою ексклюзійної хроматографії по розміру

Пегілюваний NBN піддавали ексклюзійній хроматографії по розміру на аналітичній колонці Superose 6 HRI 0/30 FPLC з використанням як рухомої фази 5мМ MES, pH 6,5, 300мМ NaCl. Розгонку на колонці проводили із швидкістю 20мл/годину. Елюювані фракції контролювали відносно оптичної щільності при 280нм. Пегілюваний NBN елюювали у вигляді окремого піку з видимою молекулярною масою приблизно 200кД відповідно до великого гідродинамічного об'єму ПЕГ. Не спостерігали ознак агрегатів. Вільний NBN, який елюється з видимою молекулярною масою приблизно 30кД, у препараті не виявляли.

Аналіз пегілюваного NBN обернено-фазовою ВЕРХ

Пегілюваний NBN NK піддавали обернено-фазовій ВЕРХ на колонці Vydac C<sub>4</sub> (5мкм, 1x250мм). Колонку обробляли, використовуючи 60мм градієнт від 40 до 60% В (буфер А: 0,1% ТФУ, буфер В: 75% ацетонітрил/0,085% ТФУ). Потік, що витікає з колонки, контролювали відносно оптичної щільності при 214нм і збирали фракції для подальшого аналізу. Пегілюваний NBN NK фракціонували на його різні ди-(60,5мм), три-(63,3мм) і тетра-(67,8мм) пегілювані компоненти обернено-фазовою ВЕРХ на колонці C<sub>4</sub>. Відносна інтенсивність піків свідчить, що співвідношення компонентів складають 5,4; 60,5 і 30,1%, відповідно. Інтенсивності піків підтверджували за допомогою MALDI-МС. Не було ознак непегілюваного NBN NK (елюється при 5-15 мм) у продукті.

Аналіз пегілюваного NBN мас-спектрометрією

Пегілюваний NBN NK знесолювали на C<sub>4</sub> Zip Tip і аналізували мас-спектрометрією у часопролітному мас-спектрометрі з лазерною десорбією/іонізацією з матриці (MALDI-TOF) Voyager-DE™ STR (PerSeptive Biosystems) з використанням як матриці синапінової кислоти. 0,5мкл очищеного білка змішували з 0,5мкл матриці на пластині для мішеней. Мас-спектрометрія пегілюваного NBN виявила форми трьох аддуктів з одним і двома зарядами. Маса, що спостерігається, 43803Д, 54046Д і 64438Д відповідають модифікаціям 2, 3 і 4ПЕГ/молекулу.

Аналіз пегілюваного NBN за допомогою картування пептиду



Специфічність реакції пегілювання оцінювали за допомогою картування пептидів. Пегілюваний NBN розділяли на ди-, три- і тетрапегілювані компоненти, які потім відновлювали, алкілювали і далі розділяли на їх одноланцюгові компоненти за допомогою ВЕРХ на колонці С4. Одержані компоненти і відновлений та алкілований немодифікований NBN NK як контроль розщеплювали Asp-N-протеїназою і одержані у результаті продукти розщеплення фракціонували обернено-фазовою ВЕРХ на колонці Vydac C<sub>18</sub> (5мкм, 1х250мм), використовуючи 60мм-градієнт від 0 до 60% В (буфер А: 0,1% ТФУ, буфер В: 75% ацетонітрил/0,085%

ТФУ). Потік, що витікає з колонки, контролювали відносно оптичної щільності при 214нм.

Послідовність NBN щурів містить чотири внутрішніх аспарагінових кислоти і тому передбачається, що вона дає простий профіль розщеплення у випадку розщеплення ендотеїназою Asp-N. Всі піки з продукту розщеплення NBN NK щура ендотеїназою Asp-N ідентифікували мас-спектрометрією і/або N-кінцевим секвенуванням за Едманом і таким чином пептидну карту можна використовувати як простий засіб для дослідження сайтів модифікації по наявності або відсутності піку. Ідентифікація різних піків сумарно показана у таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Пік за часом утримання (мм)	Маса, що спостерігається (середнє)	Теоретична маса (середнє)	Розподіл	Амінокислотна послідовність
388	1261 1 (М)	1262,4	102-113	DHLSATACGCLG
407	1090 9	1092,2	93-101	DVKSTWRTV
446	2508 4	2508,9	35-54	DELIRFRFCGSGCRRARSPH
460	2437 0	2437,8	12-34	DARGCRLRSQ LVPVSALGL GHSS
514	3456 7	3456,0	55-86	DLSLAS CRPTRY
519	4134 4		55-92 (оксид)	DLSLAS CRPTRYEA VSFM
532	4136 3*	4120,8	55-92	DLSLAS CRPTRYEA VSFM

(М): monolostopic маса

\*: у результаті окислення пептиду, що містить метіонін, при MALDI.

Оскільки NBN існує у вигляді гомодимеру, продукт NBN NK щура містить чотири можливих сайти для пегілювання, два N-кінцевих аміни з кожного ланцюга і два сайти N95K, які були створені у конструкції. У пептидній карті дипегілюваного ланцюга тільки пік, який містить пептид з мутацією NK, був змінений ПЕГ-модифікацією. ПЕГ-модифікація не впливала ні на які інші піки. Таким чином, дані картування свідчать про те, що ПЕГ-компонент специфічно зв'язаний з даним пептидом і не зв'язаний ні з якими іншими пептидами, які піддавали скринінгу. Другий можливий сайт зв'язування, N-кінець, знаходиться на пептиді, який має довжину тільки з трьох амінокислот і не виявляється у пептидній карті. Припускається, що додаткове зв'язування ПЕГ відбувається у даному сайті. Відповідно до цієї точки зору невеликий процент NBN NK щура не укорочений і містить зрілу послідовність Ala-1. Даний пептид елюється при 30мм і помітний на пептидній карті непегілюваного продукту розщеплення, але відсутній у продуктах розщеплення пегілюваного NBN NK.

Приклад 3. Оцінка ефективності внутрішньо пегілюваного нейбластину в ELISA активації кіназного рецептора (KIRA)

Ефективність пегілюваного NBN щура вимірювали з використанням NBN-залежної активації/фосфорилування c-RET як репортера активності NBN в ELISA, який був специфічний відносно присутності фосфорильованого RET. Клітини NB41A3-mRL3 лінії адгезивних клітин нейробласти мишей, яка експресує RET і GFR $\alpha$ 3, висівали

при концентрації  $2 \times 10^5$  клітин на ямку у 24-ямковій планшеті у середовище Ігла модифіковане Дульбеко (DMEM) з додаванням 10% фетальної сироватки теляти і культивували протягом 18 годин при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

Клітини промивали PBS і обробляли серійними розведеннями NBN в 0,25мл DMEM протягом 10хв. при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>. Кожний зразок аналізували у двох повторях. Клітини промивали 1мл PBS та лізували протягом 1 години при 4°C за допомогою 0,30мл 10мМ Трис-НCl, pH 8,0, 0,5% Nonidet P40, 0,2% дезоксихолату натрію, 50мМ NaF, 0,1мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1мМ фенілметилсульфонілфториду при обережному струшуванні планшетів. Потім лізати додатково перемішували багаторазовим піпетуванням і 0,25мл зразку переносили у 96-ямкові планшети для ELISA, які були покриті 5мкг/мл анти-RET-мАт (AA.GE7.3) в 50мМ карбонатному буфері, pH 9,6, при 4°C протягом 18 годин, і блокували при кімнатній температурі протягом однієї години блокувальним буфером (20мМ Трис-НCl, pH 7,5, 150мМ NaCl, 0,1% Твін-20 (TBST), що містить 1% нормальної сироватки миші і 3% бичачого сироваткового альбуміну).

Після 2 годин інкубації при кімнатній температурі ямки 6 разів промивали TBST. Фосфорильований RET реєстрували, інкубуючи ямки при кімнатній температурі протягом 2 годин з 2мкг/мл кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP) антитіла проти фосфотирозину 4G10 у блокувальному буфері, 6 разів промиваючи TBST і вимірюючи активність HRP при 450нм за допомогою реагенту для колориметричної реєстрації. Вимірювали зна-

чення оптичної щільності для ямок, оброблених лізатом або буфером, що лізує, і скоригований відносно фону сигнал наносили на графік у вигляді функції концентрації NBN, який присутній в активаційній суміші. Ефективність пегільованого NBN в ELISA KIRA складала 10нМ, що не відрізняється від ефективності вихідної речовини NBN НК. Два цикли заморожування-відтавання не впливали на ефективність, і після вказаної обробки не було істотного збільшення каламутності зразка, що свідчить про те, що зразки можна безпечно розморожувати для дослідження. У незалежних дослідженнях за оцінкою активності продукту з трьома і чотирма 10кД-ПЕГ/молекулу окремо, визначили, що аддукт з трьома ПЕГ був повністю активним, тоді як продукт з чотирма ПЕГ мав знижену активність.

Приклад 4. Фармакокінетичні дослідження внутрішньо пегільованого нейбластину щура у щурів і мишей

Досліджували фармакокінетичні властивості різних пегільованих і неpegільованих продуктів NBN у моделях на щурах і мишах.

Результати показали, що пегілювання NBN НК щура 3,3ПЕГ, 10000Д приводило до істотного впливу на час напівжиття і біодоступність нейбластину. Після в/в-введення 1мг/кг щурам Sprague Dawley, пікові рівні пегільованого NBN, що складають 3000нг/мл, реєстрували через 7 хвилин, і рівні 700нг/мл реєстрували через 24 години, 200нг/мл - через 48 годин і 100нг/мл - через 72 години. На відміну від цього, для неpegільованого NBN після в/в-введення 1мг/кг рівні 1500нг/мл реєстрували через 7 хвилин, але потім рівні швидко падали до 70нг/мл через 3 години і не реєструвалися через 7 годин. Вплив пегілювання був навіть більш вираженим у тварин, оброблених пегільованим NBN при підшкірному введенні.

Після п/к-введення 1мг/кг циркулюючі рівні пегільованого NBN досягали максимуму 200нг/мл через 24 години і зберігалися на вказаному рівні протягом трьох днів дослідження. На відміну від цього, не спостерігали NBN, що реєструється, ні в якій тимчасовій точці після введення немодифікованого NBN.

Аналізи зразків пегільованого NBN ускладнюються присутністю аддуктів, що містять 2, 3 і 4ПЕГ на молекулу, кожний з яких буде демонструвати різний ФК-профіль. У ранніх ФК-дослідженнях використовували мишей, щоб забезпечити скринінг великої кількості вибраних для дослідження речовин і способів введення. Дослідження на мишах виявили вражаючі відмінності у біодоступності вибраних речовин. Однак у тому випадку, коли оцінювали аддукт 3,3ПЕГ 10кД у щурів, виявили, що він є менш біодоступним у щурів, ніж у мишей. Вказана відмінність у біодоступності була особливо виражена після в/ч-введення. Рівні у мишей досягали 1600нг/мл через 7 годин і зберігалися на рівні 400нг/мл через 24 години. Навпаки, рівні у щурів були постійними при 100нг/мл протягом 4-48 годин.

Як нейбластин щурів дикого типу (wt-NBN), так і нейбластин із заміною Asn на Lys у положенні 95 (NK-NBN) піддавали згортанню і очищали до >95% для тестів на ефективність у моделі невропатії у

діабетичних щурів STZ. NBN дикого типу готували у композиції для безпосереднього дослідження на тварині, тоді як NK-NBN готували для пегілювання ПЕГ-SPA 10кД. Для здійснення згортання і з метою очищення розробили спосіб згортання з використанням ексклюзивної хроматографії по розміру (SEC), який дозволяє проводити ренатурацію NBN з тілець включення E. coli у великих кількостях і при високих концентраціях. Для підвищення чистоти кінцевого білка додатково до SEC застосовували стадії хроматографії як на колонці з Ni-NTA, так і на колонці з діоксидом кремнію CM. Білки піддавали всебічній характеристиці, включаючи аналіз за допомогою електрофорезу у SDS-ПААГ, ексклюзивну хроматографію по розміру, ESMS, оцінку активності в ELISA KIRA та визначення вмісту ендотоксину. SDS-ПААГ і SEC кінцевих білкових продуктів показав чистоту більше 95%. Рівень ендотоксину у кожному продукті складав <0,2EU/мг. Питома активність обох білків в ELISA KIRA складала приблизно 10нМ. NBN дикого типу готували у концентрації 1,0мг/мл, а NK-NBN готували у концентрації 2,6мг/мл у фосфатно-сольовому буфері (PBS), pH 6,5. NBN дикого типу ділили на аліквоти у пробірки об'ємом 15мл і зберігали замороженими при -70°C, тоді як NK-NBN перед поділом на аліквоти і заморожуванням піддавали пегілюванню.

Приклад 5. Згортання нейбластину дикого типу і мутейну нейбластину N95K

Обидві форми NBN експресували в E. coli у вигляді His-мічених злитих білків з сайтом розщеплення ентерокіназою, що безпосередньо прилягає до початку зрілої послідовності з 113 амінокислот. Бактерії, які експресують або NBN дикого типу (1,8кг осаду), або NK-NBN (2,5кг осаду), піддавали лізису у 2 літрах PBS, використовуючи прес Gaulin. Після центрифугування (10000об./хв.) для осадження тілець включення з кожного препарату видаляли надосади. Осади тілець включення два рази промивали буфером (0,02М Трис-HCl, pH 8,5, 0,5мМ EDTA), потім два рази промивали таким же буфером, що містить Тритон X-100 (2%, об./об.), з подальшими двома додатковими промиваннями буфером без детергенту. Обидва осади солюбілізували з використанням 6М гуанідин-гідрохлориду, 0,1М Трису, pH 8,5, 0,1М ДТТ і 1мМ EDTA. Щоб сприяти процесу солюбілізації кожний осад піддавали гомогенізації з використанням гомогенізатора Polytron з подальшим перемішуванням протягом ночі при кімнатній температурі. Розчинні білки освітлювали центрифугуванням перед хроматографією, що денатурує, через Superdex 200 (колонка об'ємом 5,5 літрів, зрівноважена 0,05М гліцином/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,0 з 2М гуанідин-HCl) при швидкості 20мл за хвилину.

Денатурований NBN ідентифікували у SDS-ПААГ. Фракції, що містять або NBN дикого типу, або NK-NBN об'єднували і концентрували приблизно до 250мл, використовуючи концентратор клітин з мішалкою Amicon об'ємом 2,5 літри. Після фільтрування для того, щоб видалити який-небудь осад, концентрований білок піддавали хроматографії, що ренатурує, по розміру через Superdex 200, зрівноважений 0,1М Трис-HCl, pH 7,8, 0,5М гуанідин-HCl, 8,8мМ відновленим глутатіоном і 0,22мМ окисленим глутатіоном. Колонку обробля-

ли, використовуючи 0,5М гуанідин-НСІ при швидкості 20мл за хвилину. Фракції, які містять ренатурований NBN дикого типу або NK-NBN, ідентифікували у SDS-ПААГ, об'єднували і зберігали при 4°C аж до того, як було необхідно видалити His-мітку.

Концентрування NBN при Ni-NTA-хроматографії (TR5919-138)

Ренатурований NBN зберігали при 4°C, що-найменше, протягом 24 годин до здійснення очищення, щоб стимулювати дисульфідне утворення між мономерами NBN. За цей час утворювався осад, і його видаляли фільтруванням через фільтрувальну установку 0,2мк PES. Щоб зменшити неспецифічне зв'язування концентрацію імідазолу у розчині білка доводили до 20мМ перед завантаженням на колонку Ni-NTA (Qiagen) об'ємом 100мл, зрівноважену буфером для колонки (0,5М гуанідин і 20мМ імідазол) із швидкістю 50мл за хвилину. Після нанесення білка колонку промивали до встановлення базової лінії тим же самим буфером. NBN елюювали зі смоли, використовуючи приблизно 300мл буферу, що елює, який містить 0,5М гуанідин-НСІ і 0,4М імідазол. Після елювання NBN діалізували протягом ночі (використовуючи діалізні трубки на 10кД) при кімнатній температурі проти десяти об'ємів 5мМ НСІ. Діаліз стимулював гідроліз забруднюючих речовин і знижував концентрації гуанідин-НСІ та імідазолу до 0,05М і 0,04М, відповідно.

Відщеплення His-мітки лізілендопептидазою або ентерокіназою

На наступний день будь-який осад, який утворювався під час діалізу, видаляли фільтруванням. Концентрацію NaCl у зразку білка робили такою, що дорівнює 0,1М додаванням 5М маткового розчину до кінцевої концентрації солі, при цьому він містив приблизно 150мМ залишкового гуанідин-НСІ. Вказану концентрацію підтверджували з використанням вимірника провідності. Крім того, додавали 1М HEPES, pH 8, до кінцевої концентрації 25мМ. Щоб відщепити мітку, до NBN дикого типу додавали лізілендопептидазу і до NK-NBN додавали ентерокіназу, обидва ферменти приблизно при співвідношенні протеази до NBN 1:300. У випадку NK-NBN використовували ентерокіназу замість лізілендо-пептидази через додатковий сайт розщеплення у мутантному білку біля Lys95. Зразки перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин і розщеплення контролювали за допомогою електрофорезу у SDS-ПААГ.

Видалення His-мітки Ni-NTA-хроматографією

Оброблений протеазою NBN наносили на колонку Ni-NTA об'ємом 100мл, зрівноважену 0,5М гуанідин-НСІ і 20мМ імідазолом, із швидкістю 50мл за хвилину. Колонку промивали до встановлення базової лінії таким же буфером. Будь-який білок, який вимивається з колонки, об'єднували з білком, що протікає, який містить NBN без His-мітки.

Хроматографія на діоксиді кремнію CM

Після Ni-NTA-хроматографії білок відразу ж піддавали подальшому очищенню пропусканням через смолу на основі діоксиду кремнію CM. На колонку з діоксидом кремнію об'ємом 20мл, зрівноважену буфером для нанесення (5мМ фосфат, pH 6,5, 150мМ NaCl), завантажували NBN із швид-

кістю 20мл за хвилину. Колонку промивали двадцятьма об'ємами колонки буфера для промивання (5мМ фосфат, pH 6,5, 400мМ NaCl) і білок елюювали буфером, що елює, який містить 5мМ фосфат, pH 6,5, але 1М NaCl. Елюйований білок діалізували протягом ночі проти одного фосфату, щоб знизити концентрацію солі до 100мМ у випадку NK-NBN і 150мМ у випадку NBN дикого типу. Обидва зразки фільтрували через фільтрувальну установку 0,2мк PES, аналізували у SDS-ПААГ і зберігали при 4°C аж до того, як була потрібна подальша характеристика і/або пегілюваний білок.

NBN дикого типу і NK-NBN піддавали аналізу відносно УФ-спектрів, щоб оцінити їх поглинання при 280. Використовуючи кварцову мікрокувету і обнуління у порівнянні з одним буфером, 100мкл або NBN дикого типу, або NK-NBN безперервно сканували від 230 до 330нм, використовуючи спектрофотометр Beckman. На основі даного аналізу визначили, що концентрація NBN дикого типу складала 1,1мг/мл, а концентрація NK-NBN - 2,6мг/мл (для кожного білка використовували A280 нм-E<sup>0,1%</sup>=0,5). Менше 1% осажденої речовини ідентифікували на основі поглинання при 330нм.

Щоб оцінити чистоту обох препаратів білка, кожний зразок (0,5мг) піддавали ексклюзійній хроматографії по розміру через колонку 16/30 Superdex 75. Колонку зрівноважували 5мМ фосфатом, pH 6,5, що містить 400мМ NaCl, і обробляли при швидкості потоку 1,5мл за хвилину. На основі поглинання при 280нм і NBN дикого типу, і NK-NBN мігрували у вигляді окремого піку з очікуваною молекулярною масою (23-24кД) і вони не містили якого-небудь істотного забруднення білка.

І NBN дикого типу, і NK-NBN відновлювали у 2,5М гуанідин-НСІ, 60мМ Трис, pH 8,0 і 16мМ ДТТ. Відновлені зразки знесолювали на короткій колонці C4 та аналізували в оперативному режимі за допомогою ESMS, використовуючи потрібний квадрупольний прилад. Вихідні дані ESMS піддавали розгортці за допомогою програми MaxEnt, щоб створити мас-спектр. Даний спосіб дозволяє звести численні заряджені сигнали в один пік, який прямо відповідає молекулярній масі у кілодальтонах (кД). Розгорнутий мас-спектр для NBN дикого типу показав, що переважний вигляд має М.м. 12046кД, яка відповідає розрахованій молекулярній масі 12046,7кД для форми білка із 113 амінокислот. Також спостерігали мінорний компонент (12063кД), що свідчить про присутність продукту окислення. У зразку NK-NBN ідентифікували три піки. Основний компонент показав видиму молекулярну масу 11345кД відповідно до розрахованої маси для форми білка із 106 амінокислот. Два інших піки мали масу 11362 і 12061кД, що свідчило про окислення NK-NBN і присутність форми із 113 амінокислот, відповідно.

Присутність у препараті NK-NBN форм із 106 і 113 амінокислот можна віднести до розщеплення ентерокіназою. Вказана протеаза від Biozyme є препаратом природного ферменту, очищеного із слизової оболонки кишечника теляти, і за повідомленнями містить невелику домішку трипсину (0,25нг трипсину на мкг ентерокінази). Таким чином, трипсин може діяти на NK-NBN з карбоксильної сторони Arg7, продукуючи переважаючу

форму із 106 амінокислот. З іншого боку лізипептидаза, яка використовується для розщеплення NBN дикого типу, володіє єдиною протеазною активністю, діючи з карбоксикінцевої сторони залишку лізину, що знаходиться у ділянці His-мітки, даючи форму зрілого NBN із 113 амінокислот. Обидві форми NBN із 106 і 113 амінокислот однаково активні у всіх досліджених аналізах і виявляють подібність у тестах на стабільність у гуанідин- $\text{HCl}$ .

Активність NBN визначали за його здатністю стимулювати фосфорилування  $\text{c-RET}$  у клітинах NB41A3-mRL3 з використанням ELISA KIRA, описаного у прикладі 3. Фосфорилування RET визначали при інкубації (2 години) іммобілізованого рецептора з кон'югованим з HRP антитілом проти фосфотирозину (4G10; 0,2мкг на ямку). Після інкубації ямки шість разів промивали TBST і потім активність HRP реєстрували при 450nm за допомогою колориметричного аналізу. Вимірювали значення оптичної щільності для ямки, обробленої лізатом або одним буфером, що лізує, коригували відносно фону і дані наносили на графік у вигляді функції концентрації нейбластину, присутнього в активаційній суміші. Дані показують, що очищений NBN приводив до появи фосфорильованого RET, що свідчить про те, що очищений NBN був активним у даному аналізі.

Приклад 6. Одержання кон'югата сироватковий альбумін-нейбластин

Нейбластин щура дикого типу у концентрації 1мг/мл у PBS обробляли 1мМ сульфо-SMCC (Pierce) та знесолювали, щоб видалити надлишок агента, який перехресно зшиває. Оскільки білок NBN дикого типу містить тільки єдиний амін на своєму N-кінці і не має вільних сульфгідрильних груп, припускали, що результатом реакції з SMCC буде сайт-специфічна модифікація NBN за допомогою SMCC, зв'язаним з N-кінцем.

60мкг кон'югата NBN-SMCC інкубували з 120мкг бичачого сироваткового альбуміну та аналізували відносно ступеня перехресного зшивання у SDS-ПААГ. BCA містить одну вільну SH-групу і, отже, очікується, що реакція з кон'югатом NBN-SMCC приведе до модифікації у вказаному сайті за допомогою малеїміду на SMCC. При вказаних умовах спостерігали дві додаткові смуги з більш високою молекулярною масою, які відповідають за масою модифікації NBN одним BCA-компонентом і двома молекулами BCA, оскільки кожна молекула NBN містить два N-кінці, які можуть піддаватися реакції і, отже, смуги узгоджуються з даною точкою зору. Утворення вказаних смуг супроводжувало зменшення інтенсивності смуг NBN-SMCC і BCA. На основі інтенсивності смуг NBN, що залишається, реакція, можливо, протікала до завершення на 70-80%.

Однозаміщений продукт очищали від реакційної суміші, піддаючи матеріал катіонообмінній хроматографії та ексклюзійній хроматографії по розміру на колонці Superdex 200 (Pharmacia), по суті як описано для досліджень пегілювання, що обговорюється вище. Фракції з колонки при гел'фільтрації аналізували у SDS-ПААГ, і фракції, що містять однозаміщений продукт, аналізували відносно вмісту білка по оптичній щільності при 280nm. Оскільки маса BCA приблизно у два рази вище маси нейбластину, уявну концентрацію ділили на 3, щоб одержати еквівалент NBN. Вказану фракцію піддавали аналізу відносно функції в ELISA KIRA. Значення  $\text{IC}_{50}$  і для NBN дикого типу, і для BCA-кон'югованого NBN складали 3-6нМ, що свідчить про те, що кон'югація з BCA не заважає функціонуванню.

Хоча вказані попередні дослідження проводили з BCA, відповідні білки сироваткового альбуміну щурів і людини також містять вільну групу SH. Отже, подібний спосіб можна застосовувати для створення кон'югата сироватковий альбумін щура-NBN щура для проведення досліджень ФК та ефективності у щурів і кон'югата сироватковий альбумін людини-NBN людини для проведення клінічних випробувань. Подібним чином SMCC можна замінити будь-яким з ряду агентів, що перехресно зшивають, які містять групу, що реагує з аміногрупою, з одного боку і групу, що реагує з тіолом, з іншого боку. Прикладами агентів, які перехресно зшивають, що реагують з аміном, які вбудовують малеїмід, що реагує з тіолом, є AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS або GMBs, прикладами агентів, які вбудовують галогенацетатну групу, що реагує з тіолом, є SBAP, SIA, SIAB, і прикладами агентів, які надають захищений або незахищений тіол для реакції з сульфгідрильними групами з одержанням зв'язку, що відновлюється, є SPDP, SMPT, SATA або SATP, які всі доступні з Pierce. Такі агенти, що перехресно зшивають, є тільки приблизними, і є допустимою велика кількість альтернативних способів зв'язування N-кінця NBN з сироватковим альбуміном. Фахівець у даній області також може створити кон'югати з сироватковим альбуміном, мішенню в яких не є N-кінець NBN або тіольний компонент сироваткового альбуміну. Також передбачається, що функціональними будуть злиття NBN-сироватковий альбумін, створені з використанням генетичної інженерії, коли NBN зливають з геном сироваткового альбуміну на N-кінці, C-кінці або на обох кінцях.

Даний спосіб можна поширити за допомогою звичайного адаптування на будь-який кон'югат NBN-сироватковий альбумін, результатом якого може бути продукт з пролонгованим часом напівжиття у тварин і, отже, у людини.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Biogen, Inc.  
 Sah, Dinah W.Y.  
 Pepinsky, Blake R  
 Borjack-Sjodin, Paula Ann  
 Miller, Stephan S  
 Rossomando, Anthony

<120> Кон'югати нейбластину з полімерами та способи їх застосування

<130> 00689-506-061

<140> Ще не передана

<141> 2002-01-23

<150> 60/266,071

<151> 2001-02-01

<160> 13

<170> Патент, версія 2.1

<210> 1

<211> 111

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: консенсуєна послідовність

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (3)

<223> Де Хаа являє собою Gly або Thr

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (4)

<223> Де Хаа являє собою Pro або Arg

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (5)

<223> Де Хаа являє собою Gly або Ser

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (10)

<223> Де Хаа являє собою Ala або Thr

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (11)

<223> Де Хаа являє собою Ala або Thr

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (12)

<223> Де Хаа являє собою Gly або Asp

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (26)

<223> Де Хаа являє собою Arg або Ser

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (33)

<223> Де Хаа являє собою Arg або Ser

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (38)

<223> Де Хаа являє собою Val або Ile

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (51)

<223> Де Хаа являє собою Val або Ile

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (53)

<223> Де Хаа являє собою Pro або Gln

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (69)

<223> Де Хаа являє собою Pro або Ser

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (76)

<223> Де Хаа являє собою Val або Ile

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; ВАРИАНТ

&lt;222&gt; (103)

&lt;223&gt; Де Хаа являє собою Arg або His

&lt;400&gt; 1

Ala Gly Xaa Xaa Xaa Ser Arg Ala Arg Xaa Xaa Xaa Ala Arg Gly Cys  
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Xaa Ala Leu Gly Leu Gly His  
 20 25 30

Xaa Ser Asp Glu Leu Xaa Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg  
 35 40 45

Ala Arg Ser Xaa His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly  
 50 55 60 65

Ala Leu Arg Xaa Pro Pro Gly Ser Arg Pro Xaa Ser Gln Pro Cys Cys Arg  
 70 75 80

Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp  
 85 90 95

Arg Thr Val Asp Xaa Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 100 105 110

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; Білок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys  
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His  
 20 25 30

Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg  
 35 40 45

Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala  
 50 55 60

Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys  
 65 70 75 80

Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser  
 85 90 95

Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu  
 100 105 110

Gly

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; Білок

<210> 3  
 <211> 113  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus

<400> 3

Ala	Gly	Thr	Arg	Ser	Ser	Arg	Ala	Arg	Thr	Thr	Asp	Ala	Arg	Gly	Cys
1				5					10					15	
Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His
			20					25					30		
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Ile	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg
		35					40					45			
Arg	Ala	Arg	Ser	Gln	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala
	50					55					60				
Gly	Ala	Leu	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Ile	Ser	Gln	Pro	Cys
	65				70					75				80	
Cys	Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser
				85					90					95	
Thr	Trp	Arg	Thr	Val	Asp	His	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu
		100						105					110		

Gly

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> Білок  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4

Ala	Gly	Thr	Arg	Ser	Ser	Arg	Ala	Arg	Ala	Thr	Asp	Ala	Arg	Gly	Cys
1				5					10					15	
Arg	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Pro	Val	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	His
			20					25					30		
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Ile	Arg	Phe	Arg	Phe	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Arg
		35					40					45			
Arg	Ala	Arg	Ser	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala
	50					55					60				
Gly	Ala	Leu	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Ile	Ser	Gln	Pro	Cys
	65				70					75				80	
Cys	Arg	Pro	Thr	Arg	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Met	Asp	Val	Asn	Ser
				85					90					95	
Thr	Trp	Arg	Thr	Val	Asp	His	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Cys	Gly	Cys	Leu
		100						105					110		

Gly

<210> 5  
 <211> 675  
 <212> ДНК  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5  
 atggaactgg gacttggaga gctactgca ttgtccact gcctccggcc taggtggcaa 60  
 ccagccttgt ggccaacct agctgtcta gccctgtga gcagcgtcac agaagcttcc 120  
 ctggaccaa tgtcccgag cccgectct cggatgttc cctcccggt cctggcgccc 180  
 ccaacagact aacctctgg gggacacacc gcacatctgt gcagcgaag agccttgca 240  
 ccacgcgc agtctctca gcccgaccc ccaacaagg gtcgcgcgt ccagctctct 300  
 ccgctgccc tcccggggc acgcgggct cgtgcaggaa cccggagcag ccgcgcaagg 360  
 gctacagatg cggcgggct cgcctgccc tcacagctgg tgcgggtgag cgtctcggc 420  
 ctgggccaca gctcgaaga gctgatacgt ttcgcttct gcagcgggtc gtgcgcga 480  
 gcaagctccc cgaagatct cagcctggcc agcctgctgg gcgcggggc cctgcggtct 540  
 cctccgggt cccggcgat cagccagccc tgttgccgc ccactgcta tgaggcagtc 600  
 tcttcctgg acgtgaacag cactggaga accgtggacc atctctccg caccgcctgc 660  
 ggtgtctgg gctga 675

<210> 6  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності: KD2-310  
 Олігонуклеотид

<400> 6  
 gtatctttca tggacgtaa gtctacatgg agaaccgtag atcatctatc tgcaacc 57

<210> 7  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності: KD3-211  
 Олігонуклеотид

<400> 7  
 ggttcagat agatgatcta cggttotcca tctagacttt acgtccatga aagatac 57

<210> 8  
 <211> 50  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності: KD3-254  
 Олігонуклеотид



&lt;400&gt; 8

gctggaactc gcagctctcg tgctcgtgca acggatgcaa aaggtgtcg

50

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: KD2-255

Олігонуклеотид

&lt;400&gt; 9

cgacagcctt ttgcattcgt tgcaagagca cgagagctgc gattccagc

50

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: KD3-258

Олігонуклеотид

&lt;400&gt; 10

ggagccggag cactaaaatc tccccgggat ctagacc

37

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: KD3-259

Олігонуклеотид

&lt;400&gt; 11

ggctctagatc ccgggggaga ttttagtgct ccggetcc

38

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: KD3-256

Олігонуклеотид

51

82983

52

&lt;400&gt; 12

gaagaattaa ttaagtttcg tttttgttca gg

32

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: KD3-257

Олігонуклеотид

&lt;400&gt; 13

cctgaacaaa aacgaactt aattaattcg tc

32